UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1956 — N° 84

UN NOUVEAU TEST DE DYSPROTÉINÉMIE : LE TEST AU MOLYBDATE

Travail effectué au Laboratoire de Chimie biologique et médicale de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux (Professeur F. Tayeau)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le Lundi 2 Juillet 1956

PAR

Jean MARQUEVIELLE

PHARMACIEN
DOCTEUR ÈS SCIENCES
CHEF DE TRAVAUX ET CHARGÉ DE COURS
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Né à Issoire (Puy-de-Dôme), le 11 Septembre 1926.

Examinateurs de la Thèse :

MM. TAYEAU, professeur..... *Président*
MAYER, professeur.....
PAUTRIZEL, professeur..... *Juges*
TINGAUD, agrégé.....

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1958

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547307_0049

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1956 — N° 84

UN NOUVEAU TEST DE DYSPROTÉINÉMIE : LE TEST AU MOLYBDATE

Travail effectué au Laboratoire de Chimie biologique et médicale de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux (Professeur F. Tayeau)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le Lundi 2 Juillet 1956

PAR

Jean MARQUEVIELLE

PHARMACIEN
DOCTEUR ÈS SCIENCES
CHEF DE TRAVAUX ET CHARGÉ DE COURS
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Né à Issoire (Puy-de-Dôme), le 11 Septembre 1926.

Examinateurs de la Thèse :

MM. TAYEAU, professeur..... *Président*
MAYER, professeur..... *Juges*
PAUTRIZEL, professeur..... *Juges*
TINGAUD, agrégé..... *Juges*

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1958

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. DUPERIÉ, CHELLE, G. PORTMANN.

DOYEN : M. SIGALAS. — ASSESSEUR : M. TAYEAU.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, ANDERODIAS, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, CHARRIER, DUBREUIL, CRUCHET, PERRENS, CREYX, MAURIAC GOLSE.

PROFESSEURS TITULAIRES :

MM.	
G. PORTMANN	Clinique d'oto-rhino-laryngologie.
F. PAPIN	Clinique chirurgicale
R. SIGALAS	Zoologie et parasitologie
E. AUBERTIN	Clinique médicale et des maladies infectieuses
X. J. DUBECQ	Clinique odonto-stomatologique
G. VITTE	Pharmacie
R. FABRE	Physiologie
P. DELMAS-MARSALET	Clinique des maladies nerveuses et mentales
C. JOULIA	Clinique des maladies cutanées et syphilitiques
M. RIVIERE	Clinique d'accouchements
R. DE GRAILLY	Clinique médicale
R. DARGET	Clinique des maladies des voies urinaires
P. DERVILLEE	Médecine légale et médecine du travail
A. FONTAN	Clinique médicale des maladies des enfants
N	Hygiène et Clinique de la tuberculose
C. PIFFAULT	Physique médicale et pharmaceutique
R. CASTAGNOU	Toxicologie et hygiène appliquée
J. REBOUL	Electroradiologie et clinique d'électricité médicale
L. MASSE	Clinique chirurgicale
R. GIRARD	Botanique et cryptogamie
P. MESNARD	Chimie
R. DUFOUR	Anatomie
P. BROUSTET	Clinique médicale
J. MAGENDIE	Clinique gynécologique
F. TAYEAU	Chimie biologique et médicale
G. MAYER	Anatomie générale et histologie
P. BLANQUET	Physique pharmaceutique (T. P.)
R. SARIC	Pathologie générale et expérimentale
L. POUYANNE	Clinique chirurgicale infantile et orthopédie
J.-J. DUBARRY	Hydrologie thérapeutique et climatologie
F.-J TRAISSAC	Thérapeutique
R MAHON	Accouchement et obstétricie sociale
R. PAUTRIZEL	Immunologie (T. P.)
G. MOUSTARDIER	Bactériologie
A. LACHAPELE	Carcinologie
P. CAZAUX	Hydrologie pharmaceutique (T. P.)
E. BESSIERE	Clinique ophtalmologique
H. LEGER	Anatomie pathologique et microscopie clinique
J. MASQUELIER	Matière médicale
G. MORETTI	Médecine et hygiène tropicales et Clinique des maladies exotiques
P. LAUMONIER	Pathologie et technique chirurgicales
J. LENG-LEVY	Pathologie médicale

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

Mlle ROUGIER (Physiologie), M. DESPONS (Oto-rhino-laryngologie).

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

MM.	
R. GOLSE	Pharmacie (1re Section)
F. RIGAUD	Anatomie
E. NEUZIL	Biochimie médicale
J. FAURE	Pathologie expérimentale
R. QUILICHINI	Pharmacie (2e Section)
R. STOLL	Histologie
H. CABANIE	Anatomie
J. DUHAMEL	Physique médicale
P. ROMAIN	Pharmacie (1re Section)

CHARGÉS DES FONCTIONS DE MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

MM. J. MARQUEVIELLE (Biochimie médicale); J. BIRABEN (Anatomie pathologique)

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.	
P. LE COULANT	Dermatologie et syphiligraphie
M. BERGOUIGNAN	Médecine générale
J CHAVANNAZ	Chirurgie générale
P. VERGER	Pédiatrie et puériculture
J. LANGE	Urologie
L. CHASTRUSSE	Obstétrique
P. L'EPEE	Médecine légale et médecine du travail
J. VILLAR	Chirurgie générale
R. TINGAUD	Chirurgie générale
J. DEPAULIS	Chirurgie générale
A. LAVIGNOLLE	Médecine générale
G. FAUGERE	Obstétrique
P. BENOIT	Odonto-stomatologie
C. MARTIN-DUPONT	Médecine générale
J. DAVID-CHAUSSE	Médecine générale
J. RIVIERE	Médecine générale
P. DARMAILLACQ	Chirurgie générale
L. CORCELLE	Ophtalmologie
M. PORTMANN	Oto-rhino-laryngologie
P. FREOUR	Pneumo-phtisiologie
M. BLANC	Neurologie et psychiatrie

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.	
J. DESPONS	Oto rhino-laryngologie
L. CHASTRUSSE G. FAUGERE	Accouchements
P. VERGER G. PERY	Puériculture
F. COUSTOU	Législation pharmaceutique
H. LAUBIE	Cryptogamie
G. TEMPERE	Organographie et physiologie végétale
R. NIVET	Chimie biologique analytique
R BABIN	Chimie analytique
J. VILLAR J. CHAVANNAZ R. TINGAUD F. LAPORTE	Pathologie chirurgicale
J. BAILENGER	Zoologie pharmaceutique
Mme LINQUETTE	Physiologie
Mlle LARCEBAU	Toxicologie et Hygiène
R. CORTESI	Phytopharmacie
J.-M. AUBY	Droit médical international
P. L'EPÉE	Médecine légale
J. RIVIÈRE	Séméiologie médicale
J. DEPAULIS	Séméiologie chirurgicale
R. STOLL	Embryologie
DULONG DE ROSNAY	Bactériologie
M. BERGOUIGNAN. A. LAVIGNOLLE	Pathologie médicale
J. de LOSTALOT	Pharmacodynamie
J. DUHAMEL	Statistique appliquée à la biologie
P. LE COULANT	Vénéréologie
H. PARLANGE	Optique
R. MANDOUL	Parasitologie
V. DARGELOS	Bactériologie

Le Secrétaire principal de la Faculté : André GAYRAUD

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

A NOS MAITRES
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE BORDEAUX

A NOS MAITRES
DE LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE BORDEAUX

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. SIGALAS

DOYEN DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX
PROFESSEUR DE ZOOLOGIE ET PARASITOLOGIE
DIRECTEUR HONORAIRE DE LA STATION BIOLOGIQUE D'ARCACHON
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
CROIX DE GUERRE
OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES
CHEVALIER DANS L'ORDRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE
CHEVALIER DU MÉRITE MARITIME
COMMANDEUR DANS L'ORDRE DE L'ÉTOILE NOIRE

Auprès de qui nous avons toujours trouvé le plus bienveillant accueil et le plus complet appui en toutes circonstances.
Qu'il nous soit permis de lui exprimer notre très profond respect et nos sentiments de bien vive gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR L. CHELLE

PROFESSEUR HONORAIRE DE CHIMIE
DOYEN HONORAIRE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES
CHEVALIER DANS L'ORDRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE

Sa paternelle bienveillance et ses conseils nous ont toujours été des plus précieux.
Hommage respectueux et profondément reconnaissant.

A NOS JUGES :

MONSIEUR LE DOCTEUR R. TINGAUD

AGRÉGÉ DE CHIRURGIE GÉNÉRALE

CHIRURGIEN DES HÔPITAUX

CHEVALIER DES PALMES ACADÉMIQUES

Qui nous a fait l'honneur de bien vouloir siéger dans notre jury de thèse.
Respectueux hommage.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. PAUTRIZEL

PROFESSEUR D'IMMUNOLOGIE

DOCTEUR ÈS SCIENCES

DIRECTEUR DU LABORATOIRE DÉPARTEMENTAL DE SÉROLOGIE

EXPERT DE L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

CROIX DE GUERRE 1939-1945

CHEVALIER DES PALMES ACADÉMIQUES

Dont la grande amabilité à notre égard ne s'est jamais démentie.
Témoignage de respectueuse sympathie.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. MAYER

PROFESSEUR D'ANATOMIE GÉNÉRALE ET HISTOLOGIE

OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES

Dont nous avons particulièrement apprécié l'enseignement, et qui nous a souvent fait bénéficier de son érudition.
Nous sommes heureux de le compter parmi nos juges.

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR F. TAYEAU

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE

ASSESSEUR DU DOYEN

DOCTEUR ÈS SCIENCES

OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES

MÉDAILLE D'HONNEUR DU SERVICE DE SANTÉ DE LA MARINE

Vous nous avez accueilli tout jeune élève dans votre laboratoire et guidé pas à pas dans nos études, puis sur la voie que vous nous avez tracée auprès de vous.

Nous sommes fier de vous avoir pour Maître, et heureux de pouvoir nous compter parmi vos collaborateurs.

Nous vous dédions ce travail, gage de notre respectueuse déférence et de notre fidèle attachement.

UN NOUVEAU TEST DE DYSPROTÉINÉMIE : LE TEST AU MOLYBDATE

AVANT-PROPOS

Les progrès incessants de la Science ont pris une telle extension qu'il est devenu difficile — voire même impossible — de suivre simultanément l'évolution des différentes disciplines. Une inévitable spécialisation en est résultée.

Dans le domaine médical, cette spécialisation a dépassé toutes les prévisions et certains auteurs, beaucoup plus compétents que nous, en ont déjà discuté les conséquences [115].

La nécessité d'approfondir un sujet a souvent amené son auteur à en resserrer de plus en plus les contours. Les sciences médicales, et la biochimie médicale en particulier, doivent, il nous semble, se préserver de cette tendance. Si, en effet, dans un service de biochimie de Faculté de médecine, la recherche biochimique pure et l'expérimentation doivent constituer l'essentiel des préoccupations de ceux qui y travaillent, il n'en est pas moins vrai que, malgré les difficultés, des travaux concernant plus particulièrement l'application clinique doivent aussi trouver leur place. S'il n'en était pas ainsi, les services scientifiques de nos Facultés de médecine failliraient à leur mission.

C'est animé par cet état d'esprit que nous avons désiré transposer à la biologie clinique les résultats que nous avions obtenus au cours de recherches scientifiques pures et qu'après avoir étudié les complexes protéines-molybdate (*), *nous avons mis au point un test de dysprotéinémie, puis nous l'avons étudié sur un certain nombre de malades.*

La première partie de notre travail consiste en un rappel de nos connaissances sur les protéines du sérum sanguin et

(*) Dans ce travail, nous avons exclusivement en vue l'interaction des protéines sériques et du paramolybdate d'ammonium. C'est pour éviter de fastidieuses redites que nous écrirons fréquemment *molybdate* en lieu et place de paramolybdate d'ammonium.

leur fractionnement, puis sur les dysprotéinémies et leur étude.

Dans la deuxième partie, nous indiquons les modalités d'action du molybdate d'ammonium sur les protéines sériques qui ont servi de base physico-chimique à nos investigations cliniques. Nous discutons la réalisation d'un test de dysprotéinémie au moyen de ce sel et nous en étudions l'application à divers cas pathologiques en comparant les résultats obtenus avec ceux fournis par certains tests classiques d'étude des dysprotéinémies.

Nous ne voudrions pas entrer dans le détail de nos recherches sans adresser nos remerciements à tous ceux qui nous ont aidé à les réaliser.

De nombreux chefs de services hospitaliers ont bien voulu nous accueillir dans leur service et nous fournir la matière première nécessaire à nos investigations, en particulier MM. les professeurs Creyx, Bonnin, Fontan, Broustet, Traissac, Leng-Lévy, Moretti, ainsi que M. Mesnier, chef de laboratoire au Centre régional de Transfusion sanguine. Que tous, de même que leurs chefs de clinique et internes, veuillent bien trouver ici l'expression de notre gratitude.

Notre ami R. Jensen, chef du service de Toxicologie à la Caisse régionale de Sécurité sociale de Bordeaux, s'est souvent intéressé à notre travail. Il nous a, en particulier, initié aux techniques polarographiques et nous a aidé dans l'interprétation des polarogrammes obtenus. Qu'il trouve ici tous nos remerciements.

Notre camarade, le docteur R. Nivet, assistant de Chimie biologique à la Faculté de Médecine et de Pharmacie, nous a fait profiter de sa haute compétence en matière d'électrophorèse, tandis que M^lle D. Duhau, aide technique de l'Institut National d'Hygiène, mettait durant de nombreux mois son habileté et son dévouement à notre service. Nous les en remercions vivement.

Malgré son éloignement, le docteur E. Neuzil, maître de conférences agrégé de Biochimie médicale, nous a souvent apporté l'aide précieuse de ses conseils judicieux. Nous lui en exprimons notre profonde gratitude.

Notre reconnaissance respectueuse va enfin à notre maître, M. le professeur Tayeau, qui, après nous avoir inspiré le sujet de nos recherches, en a suivi pas à pas la réalisation malgré les lourdes charges qui lui incombent. Son aide et ses conseils en toutes circonstances ne nous ont jamais fait défaut.

PREMIÈRE PARTIE

NOTIONS GÉNÉRALES SUR LES PROTÉINES SÉRIQUES ET LES DYSPROTÉINÉMIES

CHAPITRE PREMIER

LES PROTÉINES DU SÉRUM SANGUIN ET LEUR FRACTIONNEMENT

Parmi les nombreuses entités biochimiques que renferme le sérum sanguin, les protéines, envisagées du point de vue quantitatif, occupent, et de loin, la première place : le sérum d'un homme adulte normal contient, en effet, 70 à 80 g de protéines par litre. Ce fait justifierait à lui seul l'intérêt constant que les biologistes leur ont toujours porté.

Cette dénomination commune recouvre à la vérité des composés nettement différents : les masses particulaires, toujours considérables, s'échelonnent de 35.000 (hémocupréine) à 1.300.000 (lipoprotéine β_1); la plupart sont des particules fort dissymétriques, le rapport des axes variant de 5/1 à 18/1; les mobilités électrophorétiques sont diverses; il en va de même des constantes de sédimentation ou des solubilités; il existe également d'importantes différences dans les teneurs en acides aminés de toutes ces fractions. Cette diversité dans les propriétés physico-chimiques est sans doute en rapport avec la large gamme de leurs fonctions physiologiques et biochimiques.

L'étude des protéines sériques rencontre des difficultés nombreuses, et ceci pour plusieurs raisons :

1° Il s'agit de substances fragiles, instables et qui se transforment irréversiblement dès que l'on met en œuvre une technique tant soit peu brutale; on ne connaît d'ailleurs aucun autre solvant que l'eau qui soit susceptible de les dissoudre sans les altérer.

2° L'isolement des protéines diverses que l'on rencontre dans le sérum est difficile, car leurs propriétés physiques et chimiques, malgré leur diversité, sont assez voisines, alors même que leurs rôles biologiques diffèrent considérablement.

3° Les molécules protéiques sont hérissées de nombreuses fonctions chimiques, grâce auxquelles elles se montrent susceptibles de capter et d'entraîner des molécules satellites, dont l'élimination est souvent très difficile. Aussi dans de nombreux cas, les fractions protéiques que l'on a pu séparer ne correspondent-elles pas à des holoprotéides; il est en fait rare qu'une fraction protéique quelconque, même bien différenciée et séparée avec soin, ne contienne pas quelque satellite plus ou moins solidement combiné à la protéine : glucides, phospholipides, stérols, pigments biliaires, vitamines, oligoéléments, etc. De nombreuses fractions parfaitement caractérisées sont, en réalité, des associations de protéines avec des substances non protéiques qu'on désigne, depuis Macheboeuf [78], par le terme de *cénapses*. Il peut même arriver que, dans de telles associations, le satellite soit quantitativement plus important que la protéine : nous citerons par exemple la globuline β_1 de la fraction III-0 de Cohn, qui ne contient que 25 p. 100 de protéines [95, voir 80]. Et même si l'on parvient à débarrasser intégralement les protéines de leurs satellites, on obtient dans de nombreux cas des substances qui n'existent pas à l'état libre dans le sérum, donc de véritables *artefacts*, dont les propriétés physico-chimiques et biologiques peuvent être fort différentes de celles de la cénapse existant dans le sérum.

4° Parmi les protéines plasmatiques et sériques, se trouvent des enzymes protéolytiques qui digèrent lentement les autres protéines : lorsqu'une préparation protéique contient une telle diastase, ses protéines ne peuvent demeurer intactes qu'à l'état rigoureusement sec; malheureusement, certains constituants protéiques ne peuvent être desséchés sans subir une transformation irréversible.

Depuis longtemps déjà, les biochimistes se sont néanmoins efforcés de séparer chacun des nombreux constituants protidiques du plasma ou du sérum, holoprotéides ou cénapses diverses, dans un état de pureté maximum et aussi voisin que possible de l'état natif. Pour tenter de séparer, puis de purifier ces diverses protéines, il a parfois fallu créer des techniques spécialement adaptées, généralement assez compliquées.

Quelles sont à l'heure actuelle les techniques de fractionnement les plus utilisées dans le cadre des protéines du sérum sanguin ? Nous pouvons les répartir en cinq groupes que nous allons maintenant passer en revue.

I. — FRACTIONNEMENT PAR MODIFICATION DE LA FORCE IONIQUE

Beaucoup de techniques de fractionnement des protéines sont fondées sur leur baisse de solubilité lorsque la force ionique du liquide s'élève suffisamment. Il s'agit d'une application de l'effet de relargage des sels à forte concentration, qui correspond au phénomène dénommé « salting out effect » par les auteurs de langue anglaise.

E. J. Cohn a montré en 1926 que, dans le domaine de concentration saline où une protéine pure précipite, le logarithme de sa solubilité S est une fonction linéaire de la force ionique Γ /2 de la solution :

$$\log S = B - K \Gamma /2$$

K étant une constante caractéristique de la protéine et du sel (constante de relargage), B une constante fonction linéaire du *p*H et en relation avec la température (*).

En accord avec cette notation mathématique, la courbe qui

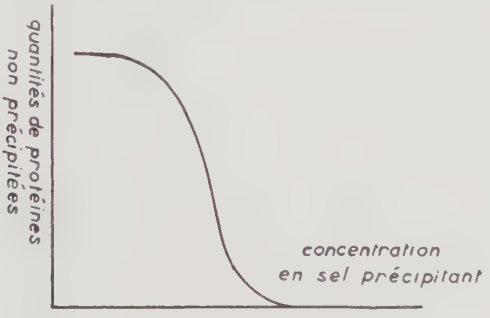

Fig. 1.

(*) La force ionique d'une solution est donnée par la formule $\Gamma/2 = 1/2 \Sigma C Z^2$, dans laquelle C est la concentration molaire des ions présents et Z leur valence. C'est donc la demie somme des produits de la concentration molaire des ions présents par le carré de leur valence. Par exemple, la force ionique d'une solution 0,1 M de ClNa sera égale à 0,1 (deux ions monovalents), alors que la force ionique d'une solution 0,1 M de SO_4Na_2 sera de 0,3 (deux ions monovalents, Na^+ et un ion bivalent, SO_4^{--}).

représente les variations de la concentration d'une protéine restant en solution lorsque l'on précipite cette protéine par des concentrations croissantes d'un sel est une courbe exponentielle (fig. 1).

Si l'on a affaire à un mélange de *n* protéines pures différentes, la courbe présente *n* segments qui sont chacun de type exponentiel. Il existe entre deux segments successifs un point anguleux tel que P (fig. 2).

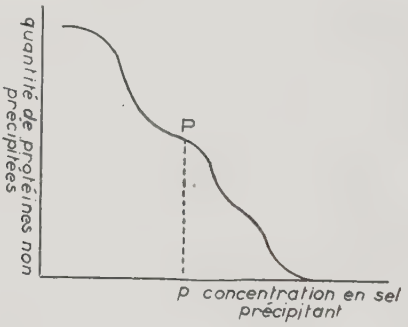

Fig. 2.

Si donc, l'on ajoute à la solution du mélange de protéines la quantité de sel voulue pour que la concentration en sel (et par conséquent la force ionique) soit celle correspondant à l'abscisse du point P, on réalisera un fractionnement convenable si les domaines de précipitation des deux protéines ne chevauchent pas. Le précipité recueilli contiendra toute la première fraction protidique seulement souillée par la petite quantité de la seconde fraction contenue dans l'eau mère incluse dans le précipité et par celle éventuellement adsorbée. La fraction restée dans les eaux mères ne contiendra que la très petite quantité de la première fraction restée en solution du fait que sa solubilité n'atteindrait une valeur rigoureusement nulle que pour une force ionique infinie. En remettant chaque fraction en solution, puis en la reprécipitant d'une façon identique, la purification peut être très poussée et l'on peut arriver ainsi à obtenir des fractions protidiques à un stade de pureté suffisant pour que les critères d'homogénéité aux techniques d'ultracentrifugation, d'électrophorèse et de solubilité soient satisfaits.

Mais, au contraire, si les domaines de précipitation des deux protéines chevauchent, la première se trouvera encore

présente dans le liquide lorsque l'on parviendra au point qui correspond au début de précipitation de la seconde. Dans ces conditions, le produit qui va précipiter pour des forces ioniques supérieures à celles du point P contiendra, en sus de la deuxième fraction, toute la quantité de la première qui se trouvait encore en solution pour une concentration *p*. Dès lors, le fractionnement sera beaucoup moins efficace. Malheureusement, c'est ce deuxième cas que l'on rencontre le plus souvent dans le simple relargage par les sels et nous pouvons déjà prévoir que les possibilités de fractionnement par simple augmentation progressive de la teneur en sels du milieu seront limitées. Certains résultats intéressants ont cependant été obtenus par cette méthode.

Les premiers essais dans ce domaine remontent à 1859 (*) lorsque Denis [21] proposa la séparation des protéines sériques à l'aide du *sulfate de magnésium* à saturation. Denis isolait alors une « fibrine dissoute » qui semble voisine des globulines et une « sérine » correspondant à la sérum-albumine. Les deux fractions ainsi obtenues ont été étudiées par Burckhardt [7] ; cet auteur a montré que la sérum-globuline précipitée par le sulfate de magnésium se met partiellement en solution lorsqu'on la soumet à la dialyse contre l'eau distillée; il en conclut qu'elle renferme de la sérum-albumine. Mais Hammarsten [40], reprenant en détail toutes ces recherches, prouve, inversement, que la précipitation de la sérum-globuline par la dialyse n'est jamais absolument complète, même lorsqu'elle ne contient pas trace de sérum-albumine : ceci est facile à expliquer aujourd'hui, les travaux de Marcus [87], puis l'électrophorèse, nous ayant appris combien est hétérogène la fraction *sérum-globulines*. Le fractionnement par le sulfate de magnésium a été relativement peu utilisé par la suite [130, 135].

Le *sulfate de sodium* a également été préconisé [52, 108]. Howe [54] a bien étudié le fractionnement des protéines sériques à l'aide de ce sel. Cette technique consiste à ajouter à un volume déterminé de sérum, trente volumes de solution de sulfate de sodium anhydre à 22,2 g p. 100, puis à porter le mélange à l'étuve à 37° C pendant trois heures pour éviter la cristallisation du sel : dans ces conditions la sérum-globuline précipite, tandis que l'albumine reste en solution. Divers auteurs ont modifié, perfectionné et adapté cette méthode en

(*) On trouvera dans la thèse de Martin [89] un exposé plus détaillé des diverses techniques de séparation par relargage.

vue d'opérer sur de faibles quantités de sérum [9, 71, 64, 18]. Les études électrophorétiques entreprises [39] ont montré combien les fractions obtenues sont hétérogènes. De plus, la solubilité relativement faible du sulfate de sodium permet difficilement d'atteindre des forces ioniques importantes.

Aucun sel minéral n'a été employé autant que le *sulfate d'ammonium* dans le fractionnement des protéines sériques. Proposé dès 1884 [61, 91, 109], son utilisation fut minutieusement étudiée par Hofmeister [51]. C'est à cet auteur que nous devons la séparation classique des protéines du sérum en globulines, insolubles dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation et albumines, solubles à cette même concentration. Ce fractionnement est loin d'être parfait et a suscité de nombreuses critiques [128]. Mac Farlane [77], ayant étudié par ultracentrifugation les diverses fractions obtenues à l'aide du sulfate d'ammonium à demi-saturation, a montré que les globulines en particulier contiennent des albumines. Les critères de solubilité ne sont pas mieux respectés, comme l'a prouvé Perez [104]. Des mesures de point isoionique ont permis à Tayeau et Martin [voir 89] d'arriver aux mêmes conclusions : les globulines et les albumines isolées grâce au sulfate d'ammonium à demi-saturation ne constituent pas des fractions homogènes, chacune d'entre elles étant souillée par l'autre. Les points anguleux séparant les courbes de relargage ne correspondent pas exactement à la même concentration saline pour les sérums d'espèces animales différentes (il faut une force ionique plus grande pour le sérum humain que pour le sérum de Cheval) ; de même le chevauchement des deux courbes est plus ou moins marqué selon l'espèce dont on étudie le sérum : il est nettement plus considérable pour le sérum d'Homme que pour le sérum de Cheval [89]. Certains états pathologiques s'accompagnent par ailleurs de perturbations dans la séparation des deux fractions sériques par le sulfate d'ammonium. Les études électrophorétiques n'ont fait évidemment que confirmer l'hétérogénéité des fractions obtenues par relargage au moyen de ce sel [15, 102]. Cependant, malgré ses imperfections, cette méthode de fractionnement très simple, rend encore de grands services pour certains travaux où il n'est pas nécessaire de pousser très loin les séparations de protéines, ou bien comme méthode préparatoire à un fractionnement plus efficace.

Le mélange équimoléculaire de *phosphates mono* et *dipotassiques* proposé par Butler et Montgomery [8] a été parti-

culièrement utilisé par Florkin [29], Wuhrmann et Wunderly [148], et surtout par Derrien [22, 118]. Cet auteur est ainsi parvenu à isoler du sérum humain normal trente-trois fractions bien distinctes et bien reproductibles. L'électrophorèse confirme que chacune d'entre elles correspond à une seule protéine ou à un groupe de protéines très voisines; nous voyons ainsi une méthode de fractionnement indiquer un nombre de fractions distinctes suffisamment élevé pour correspondre à ce que l'on sait de l'hétérogénéité considérable des protéines totales du sérum. Il est cependant possible qu'une même holoprotéine se retrouve dans plusieurs fractions distinctes parce qu'elle est engagée dans des cénapses différentes. Très précise, la méthode de Derrien est peu utilisée car sa réalisation est longue, laborieuse et délicate. Des techniques simplifiées ont été préconisées et semblent devoir être particulièrement intéressantes dans l'étude de certains états pathologiques [voir 80].

Cette technique de fractionnement au moyen de phosphates peut être considérée comme le type même du relargage à *p*H constant, ce mélange salin possédant un pouvoir tampon considérable (*p*H 6,5).

Parmi les sels minéraux utilisés dans le fractionnement des protéines sériques, nous citerons enfin le *sulfite de sodium*. Préconisé par Campbell et Hanna [10], il a été particulièrement étudié par Ardry [2] pour le fractionnement des protéines sériques. Cette technique de séparation, par ailleurs fort simple, donne des résultats relativement en bon accord avec ceux fournis par l'électrophorèse.

De nombreux *autres sels* minéraux ont été proposés pour la séparation des protéines sériques [voir 89]. Aucun ne semble devoir donner de meilleurs résultats que le sulfate d'ammonium et n'a été particulièrement retenu. Cependant, la formule qui permet de calculer la force ionique d'une solution montre toute l'importance de la valence des ions présents. Il en résulte que les sels de métaux lourds par exemple, pourront, à des concentrations relativement faibles, développer des forces ioniques importantes et exercer par là même un effet de relargage notable. Diverses techniques de fractionnement des protéines sériques utilisant ces composés, et notamment les sels de zinc, ont été récemment décrites et semblent riches de promesses [voir 26]. Ces corps, indépendamment de leur activité sur la force ionique du milieu, ont, de plus, l'avantage de donner souvent des combi-

naisons peu solubles avec les protéines, permettant ainsi une précipitation plus ou moins sélective. On connaît d'ailleurs l'emploi fréquent des anions et des cations lourds dans la déprotéinisation des milieux biologiques, opération encore appelée défécation (utilisation des réactifs de COURTONNE, de PATEIN et DUFAU, etc.).

Envisageant l'emploi des phosphates mono et dipotassiques, nous avons vu que ces sels permettent une séparation des protéines sériques non pas seulement en deux fractions, mais en un très grand nombre. Est-il donc possible de séparer globulines et albumines en sous-fractions ? Certainement. Nous avons déjà signalé que BURCKHARDT [7], puis HAMMARSTEN [40] avaient montré que les globulines insolubilisées par le sulfate de magnésium peuvent être subdivisées grâce à leur propriété d'être solubles ou non dans l'eau pure. Etudiant ce problème en sens contraire, MARCUS [87] observa que si l'on élimine dans le sérum sanguin les globulines qui précipitent par dilution selon la technique de PANUM [100], on obtient encore un précipité important par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Il donna le nom d'*euglobulines* à la première fraction, de *pseudoglobulines* à la seconde. FULD et SPIRO [31], puis PORGES et SPIRO [111] essayèrent de déterminer la quantité de sulfate d'ammonium à ajouter au sérum pour ne précipiter que les globulines insolubles dans l'eau; ils furent ainsi conduits à dénommer euglobulines les protéines précipitant par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation et pseudoglobulines celles qui précipitent entre le tiers et la demi-saturation. Les euglobulines et les pseudoglobulines ainsi obtenues sont-elles identiques à celles de MARCUS ? Divers travaux [30, 133] ont depuis longtemps prouvé qu'il y a tout au plus analogie mais en aucune façon identité. Enfin, toujours en ce qui concerne la séparation des globulines, l'on sait que l'électrophorèse nous révèle la présence d'au moins cinq fractions dénommées α_1, α_2, β_1, β_2 et γ dans l'ordre de mobilité décroissante.

Moins net est le fractionnement des albumines du sérum. On a cependant cherché à les subdiviser en utilisant les techniques les plus diverses. Les sels, et le sulfate d'ammonium en particulier, ont été mis à contribution. Certains auteurs purent ainsi obtenir trois fractions albuminiques [voir 89], d'autres un plus grand nombre [22, 23]. On peut parvenir à la séparation de trois fractions albuminiques par électrophorèse

prolongée suffisamment longtemps [92]. Des recherches de Machebœuf et collaborateurs [83, 82] et de Tiselius [137] semblent indiquer que certaines fractions albuminiques distinctes sont constituées par des protéines identiques et ne diffèrent entre elles que par la nature et la quantité des substances liées aux protéides.

Nous avons précédemment signalé la technique de fractionnement des protéines sériques par dilution du sérum. Il est en effet important de souligner que si, pour une force ionique suffisante, les sels minéraux ont une influence précipitante sur les protéines, à faible concentration au contraire, ils accroissent leur solubilité : c'est l'effet dissolvant bien connu des électrolytes que les auteurs de langue anglaise appellent « salting in effect ». Cet effet dissolvant de faibles quantités de sels vis-à-vis de certaines protéines peut être facilement mis en évidence dans le cas du sérum sanguin : il suffit de diluer le sérum par addition d'eau distillée pour voir se former un précipité protéique. C'est ce qu'a fait Panum dès 1851 et cela lui a permis de séparer les protéines sériques en deux grands groupes : la « sérum-caséine » qui précipite et l' « albumine » qui, dans ces conditions, reste en solution. Ces deux fractions ont été particulièrement bien étudiées ensuite par différents auteurs qui ont malheureusement cru bon, chacun pour sa part, de leur donner des dénominations particulières [voir 89].

On parvient exactement au même résultat en soumettant le sérum à la dialyse contre de l'eau distillée courante pendant assez longtemps : on voit se former lentement un précipité protéique que l'on peut redissoudre dans un peu d'eau légèrement salée; la dialyse, en éliminant les électrolytes, a fait baisser la force ionique de la solution et cela a suffi pour diminuer considérablement la solubilité de certaines globulines que l'on appelle « *euglobulines* ». Ces euglobulines ne sont homogènes ni à l'électrophorèse, ni à l'ultracentrifugation, ni au critère de solubilité. Nous avons déjà signalé qu'elles ne sont nullement identiques aux euglobulines définies par leur insolubilité dans le sulfate d'ammonium au tiers de saturation.

Il convient de remarquer que la dilution du sérum par de l'eau distillée ou la dialyse de ce sérum contre de l'eau font que l'élimination des sels et la chute de la force ionique s'accompagnent d'un abaissement automatique du *p*H qui

évolue vers le point isoionique moyen du mélange protéique et place donc certaines protéines dans une zone de moindre solubilité. D'ailleurs, divers auteurs utilisèrent empiriquement ou non ce fait en proposant de provoquer la précipitation de fractions globuliniques particulières par dilution du sérum non pas avec de l'eau pure, mais avec de l'eau saturée en anhydride carbonique [126, 146, 67] ou de l'acide chlorhydrique 0,002 N [114]. Ces techniques de fractionnement du sérum nous servent donc de transition avec le second groupe de méthodes de séparation des protéines sériques.

II. — FRACTIONNEMENT PAR MODIFICATION DU *p*H

La solubilité d'une protéine pour une force ionique donnée présente toujours un minimum au voisinage de son point isoélectrique. L'influence du *p*H sur la solubilité est toujours grande, parfois considérable; elle peut graphiquement se représenter par une courbe du type de celle de la figure 3.

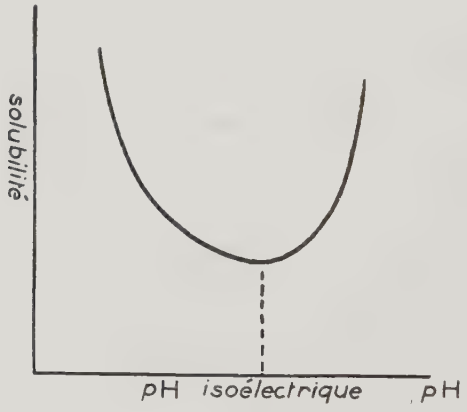

Fig. 3.

Courbe représentative de la solubilité
d'une protéine en fonction du *p*H du milieu.

La solubilité aux divers *p*H est conditionnée par la structure chimique de la molécule protéique et en particulier par le nombre et la nature des groupements chimiques ionisables qu'elle renferme. On conçoit donc que des courbes de solubilité analogues à celle de la figure ci-dessus puissent beaucoup varier d'une protéine à une autre : deux protéines peu-

vent, par exemple, avoir des solubilités voisines à un *p*H donné, mais avoir des solubilités extrêmement différentes pour d'autres conditions de *p*H. Sur ces faits sont fondées un certain nombre de techniques de fractionnement utilisant des variations de *p*H. On accroît de façon considérable la sensibilité de la technique et ses possibilités de séparation efficace en combinant les variations de *p*H et les variations de force ionique. On a pu ainsi mettre au point des techniques aboutissant à un résultat très supérieur à celui donné par le simple relargage à *p*H constant précédemment envisagé.

Nous prendrons pour exemple de ce groupe de techniques celle qui permet l'obtention de sérum-albumine cristallisée en opérant par relargage au sulfate d'ammonium et abaissement concomitant du *p*H aux environs de 5 à l'aide d'acide sulfurique 0,2 N : les albumines ainsi préparées se révèlent à l'électrophorèse et à l'ultracentrifugation beaucoup plus homogènes que celles fournies par le relargage au sulfate d'ammonium à *p*H constant.

Une intéressante application de la combinaison de la variation simultanée du *p*H et de la force ionique nous est apportée par la technique de fractionnement des globulines sériques selon Sandor [124]. Après un abaissement suffisant de la force ionique grâce à une dialyse prolongée contre du tampon phosphate de Clark et Lubbs M/150 de *p*H 7,6 à 7,8, puis une dilution à l'aide d'eau distillée, une acidification lente au moyen d'acide chlorhydrique N/20 permet d'insolubiliser successivement trois euglobulines. Ces dernières, convenablement purifiées [123], satisfont au critère d'homogénéité à l'électrophorèse et correspondent respectivement à une β_2-euglobuline, une β_1-euglobuline et une α_2-euglobuline. Celle-ci est d'ailleurs une lipoprotéine contenant plus de 30 p. 100 de lipides [141, 123]. Dans les précipités isoélectriques non purifiés, ces euglobulines sont accompagnées d'une forte quantité de γ-pseudoglobulines. Nous aurons l'occasion de revenir sur cette technique lorsque nous envisagerons les méthodes d'étude des dysprotéinémies (voir p. 40).

Cependant les fractions obtenues par ces méthodes relativement simples ne sont encore bien souvent que des mélanges de protéines voisines. Pour parvenir à subdiviser les protéines sériques en entités chimiques bien distinctes, il a fallu faire intervenir d'autres facteurs susceptibles de modifier la solubilité des protéines. On a, en particulier, introduit dans les solutions des proportions variées de substances organiques.

III. — FRACTIONNEMENT PAR ADDITION DE SOLVANTS ORGANIQUES

Lorsque l'on ajoute au sérum un solvant organique neutre hydrosoluble, la constante diélectrique du liquide diminue et ceci influe sur les interactions entre protéines et ions minéraux. La solubilité de chaque protéine est modifiée, l'influence des sels devenant considérable. En effet, la solubilité d'une protéine donnée, pour une concentration définie en un solvant organique, est fonction du *p*H, de la température et de la force ionique des sels présents. L'effet dissolvant de ces derniers (pour de faibles concentrations par conséquent) devient très important et très spécifique car il est susceptible de varier fortement d'une protéine à une autre pour un même *p*H et une même concentration en solvant organique; il est de plus très variable avec la nature et la concentration du solvant organique et avec la température, ce qui permet de jouer sur deux variables supplémentaires. Ces faits ont naturellement été mis à profit pour le fractionnement des protéines plasmatiques et sériques.

Mais les solvants organiques exercent en général à la température ordinaire une action dénaturante ou tout au moins des modifications irréversibles sur les protéines sériques. Aussi est-on souvent conduit à opérer à très basse température; dans ces conditions les protéines semblent résister sans modification à l'influence des solvants organiques; cependant, les associations lipido-protéidiques sont fréquemment rompues et de nombreuses cénapses sont détruites, alors même que la partie purement protéique est demeurée intacte.

Nous serons très bref sur ces procédés de fractionnement par addition de solvants organiques, les applications à la clinique, dans un but de diagnostic, en étant encore fort rares, sans doute en raison des difficultés techniques qu'elles présentent le plus souvent. Les principaux solvants utilisés sont l'acétone, l'éther, le méthylal, le méthanol et surtout l'éthanol.

A. — Acétone

En 1920, Piettre et Vila [106] montraient que l'acétone, utilisée dans certaines conditions, pouvait permettre le fractionnement des protéines sériques. De nombreuses recherches ont été entreprises sur ce fait, et elles ont apporté diverses

modifications et améliorations à la technique originale [voir 89]. Il est nécessaire d'opérer à de fortes concentrations en acétone et, si l'on désire éviter l'action dénaturante de ce solvant, la température doit être inférieure à 0° C, comme l'a montré Saïas [120]; la majeure partie des lipides qui sont liés aux protéines du sérum sont détachés.

B. — Ether

Ce solvant n'est pas miscible avec l'eau, mais il s'y dissout en quantité suffisante (110 ml par litre à 0° C) pour faire précipiter une petite fraction protéique. C'est surtout le plasma sanguin que l'on peut fractionner grâce à l'utilisation de l'éther. On obtient ainsi du fibrinogène [62], que l'on purifie ensuite pour servir aux applications médicales. On peut également, grâce à l'éther, séparer la prothrombine, qui possède, elle aussi, diverses applications médicales. Signalons qu'à très basse température (— 40° C) l'éther se montre capable de détacher les lipides de nombreuses lipoprotéines : c'est la technique de délipidation de Mac Farlane [76].

C. — Méthanol et méthylal

Pillemer et Hutchinson [107] ont montré que le méthanol peut être un excellent agent pour les précipitations fractionnées de protéines. Dans le cas du sérum humain normal, ils furent capables de trouver des conditions opératoires telles que l'on peut séparer les globulines et les albumines dans un état de pureté remarquable : les résultats correspondent à moins de 5 p. 100 près à ceux de l'électrophorèse.

De son côté, Delsal [19] a obtenu des résultats fort intéressants dans le fractionnement des protéines sériques par le méthylal. Il semble d'ailleurs que les mélanges de méthanol et de méthylal permettent des précipitations fractionnées extrêmement précises et spécifiques.

D. — Ethanol

Dans le cas des protéines plasmatiques et sériques, le solvant organique qui a permis d'effectuer les fractionnements les plus fructueux est sans aucun doute l'éthanol. Ce solvant, utilisé par divers auteurs [147, 28, 14], est à la base de la célèbre méthode de fractionnement de Cohn [16, 96]. L'éthanol est utilisé à concentrations diverses, en présence de faibles

forces ioniques, à des *p*H variables et à des températures variables, mais toujours inférieures à + 1° C. Cette méthode, avec quelques perfectionnements, modifications et améliorations [13, 97], a permis la création d'une véritable industrie des protéines plasmatiques qui met à la disposition de la thérapeutique de nombreux agents précieux (fibrinogène, thrombine, sérum-albumine purifiée, anticorps, globulines antihémophiliques, etc.) (*).

Rappelons que l'éthanol à de fortes concentrations (95° ou absolu) et à basse température (— 10° C) est susceptible d'enlever les lipides de presque toutes les lipoprotéines : c'est le principe de la méthode classique de délipidation de Hardy et Gardiner [42].

IV. — FRACTIONNEMENT FONDÉ SUR LES DIFFÉRENCES DE VITESSE DE SÉDIMENTATION : ULTRACENTRIFUGATION

Nous allons maintenant envisager deux techniques très précieuses, l'ultracentrifugation et l'électrophorèse, qui permettent de contrôler les fractionnements et d'apprécier le degré d'homogénéité des fractions obtenues. Ces méthodes, dont l'application aux solutions protéiques est plus rapide que l'étude du critère de solubilité, ont en outre l'avantage de fournir des renseignements directs qualitatifs et quantitatifs sur les protéines telles qu'elles se trouvent dans le sein même du plasma ou du sérum : on a donc un véritable fractionnement analytique. Mises au point pour déceler les dénaturations que pourraient provoquer des techniques de fractionnement défectueuses, elles rendent les plus grands services en clinique en montrant les modifications qualitatives et quantitatives que la maladie a réalisées aux dépens des protéines sériques.

L'ultracentrifugation consiste à placer la solution protéique étudiée dans une cellule logée dans une toupie ou *rotor* que l'on peut animer d'un mouvement de rotation extrêmement rapide (de l'ordre de 50.000 à 100.000 tours/minute). L'énorme force centrifuge ainsi développée provoque une sédimentation lente des grosses molécules, et en particulier des molécules protéiques, vers la périphérie du liquide. De la position d'une

(*) On trouvera une description de la méthode et un exposé des résultats obtenus dans un rapport de Machebœuf [80].

protéine dans la cellule après une durée de rotation donnée à vitesse angulaire connue, on peut déduire la valeur de sa *constante de sédimentation*. L'unité, S, appelée unité Svedberg, est égale à 10^{-13} secondes.

Sans entrer dans les détails techniques de la méthode que les recherches de Svedberg et son école ont mis à la disposition des biochimistes et qui ont fait l'objet de nombreux exposés [131, 102, 145], nous indiquerons simplement que l'examen d'un diagramme photographique obtenu en cours d'ultracentrifugation fournit les renseignements suivants :

1° L'appréciation de l'homogénéité ou de l'hétérogénéité de la fraction protéique étudiée, d'après le nombre de clochers obtenus;

2° La détermination des proportions relatives des diverses fractions protéiques présentes dans un mélange, d'après la surface des divers clochers;

3° L'identification des diverses protéines présentes dans le mélange étudié, la position du sommet des différents clochers à un instant donné permettant de calculer les constantes de sédimentation sans qu'il soit nécessaire d'isoler les protéines.

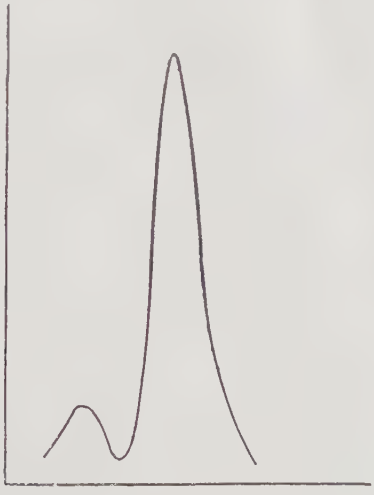

Fig. 4.

Diagramme d'ultracentrifugation.

D'autre part, en confrontant les résultats de l'ultracentrifugation avec ceux fournis par des mesures de diffusion, il

est possible de calculer la masse moléculaire des molécules protéiques et même d'obtenir des renseignements sur les dimensions de leurs diamètres principaux (grand axe et petit axe).

L'étude par ultracentrifugation des sérums humains normaux a permis de mettre en évidence trois fractions protéiques principales. Les valeurs de leurs constantes de sédimentation ainsi que leurs proportions relatives dépendent de la concentration en protéines et de la présence de sels minéraux, donc de la force ionique et de la densité du milieu. On trouve approximativement :

Constituant A = 55 p. 100; S = 4-4,5.
Constituant X = 32 p. 100; S = 6-7.
Constituant G = 12 p. 100; S = 10-12.
Constituant M = 1 p. 100; S = 16-20.

Ce dernier constituant ou composant lourd n'existe donc qu'en faibles quantités dans le sérum normal; il se rencontre au contraire en abondance au cours de certains états pathologiques (voir p. 32). En raison de son comportement à l'électrophorèse et à l'ultracentrifugation, on le dénomme encore globuline β_2M.

Il importe de se souvenir qu'une fraction homogène à l'ultracentrifugation n'est pas obligatoirement une protéine pure; plusieurs protéines différentes peuvent, en effet, avoir des constantes de sédimentation égales ou tout au moins extrêmement voisines. D'autres méthodes telles que l'électrophorèse ou l'étude de la solubilité ont permis de déceler l'existence de nombreuses protéines dans des fractions pour lesquelles l'ultracentrifugation n'avait révélé aucune hétérogénéité. C'est ainsi que certaines fractions isolées par ultracentrifugation du sérum sanguin renferment, à côté de protéines, des lipoprotéines parfois infiniment plus riches en lipides qu'en protéines et que l'électrophorèse sépare en lipoprotéines α et β. Ces composés ayant une densité relativement faible, Pedersen [103] a eu l'idée de réaliser l'ultracentrifugation dans des milieux de densité supérieure à ceux habituellement utilisés, afin de les faire flotter. Il suffit d'ajouter une quantité suffisante de ClNa au sérum pour voir le sens de sédimentation, sous l'influence de la force centrifuge, s'inverser lorsque la densité du liquide devient supérieure à celle des lipoprotéines. Par analogie avec l'ultracentrifugation ordinaire, on peut alors définir pour chaque composé une *constante de*

flottation (ou *de flottaison*), Sf, caractéristique. La densité des β-lipoprotéines est inférieure à 1,063, celle des α-lipoprotéines normales est comprise entre 1,063 et 1,210. Les constantes de flottaison s'échelonnent entre 1 et 100. Cette technique s'est révélée extrêmement fructueuse dans l'étude qualitative et quantitative des diverses lipoprotéines sériques et dans l'examen de leurs variations au cours de certains états pathologiques [32, 44, 50, 72, 73, 95, 119, voir 110].

V. — FRACTIONNEMENT FONDÉ SUR LES DIFFÉRENCES DE MOBILITÉ DANS UN CHAMP ÉLECTRIQUE : ÉLECTROPHORÈSE

Les molécules protéiques en solution aqueuse sont, on le sait, porteuses de charges électriques. Si donc on soumet une solution protéique à un champ électrique, elles migreront. Les facteurs principaux qui influent sur le sens et la vitesse de déplacement, pour une protéine donnée, sont le *p*H de la solution et le gradient de potentiel de champ électrique. Lorsque le *p*H de la solution est supérieur au *p*H isoélectrique d'une protéine, celle-ci se dirige vers l'électrode positive; elle va, au contraire, vers l'électrode négative si le *p*H est inférieur à son *p*H isoélectrique.

Sur ce principe sont fondés deux groupes de techniques : l'électrophorèse en milieu liquide et la microélectrophorèse sur papier.

A. — Electrophorèse en milieu liquide ou en cellule

L'électrophorèse des protéines selon la méthode du biochimiste suédois Tiselius est trop classique et a fait l'objet de suffisamment d'exposés [136, 79, 132] pour que nous n'ayons pas besoin de l'étudier ici en détail. Les progrès théoriques réalisés grâce à cette méthode dans l'étude des protéines sériques ont été considérables et ses applications à la clinique sont aussi nombreuses qu'importantes. Dans le cas d'un sérum humain normal, on obtient une séparation en cinq fractions principales bien individualisées (voir p. 31).

L'étude d'un diagramme photographique pris en cours d'électrophorèse est susceptible d'apporter exactement les mêmes renseignements que l'étude d'un diagramme d'ultracentrifugation : seul le calcul des *mobilités électrophorétiques*

(chemin parcouru par la protéine, en centimètres par seconde, pour un gradient de potentiel d'un volt par centimètre) remplace le calcul des constantes de sédimentation.

Le calcul des proportions des diverses protéines dans un mélange, par la mesure des surfaces comprises entre la courbe représentative du gradient d'indice de réfraction et l'axe des abscisses, est toujours assez peu rigoureux. En effet, les molécules satellites des protéines influent, elles aussi, sur l'indice de réfraction de la solution qui les contient; la surface du clocher correspondant à une fraction protéique donnée est donc fonction de l'ensemble protéine + satellite et non pas de la protéine seule. D'autre part les ions non protéiques du tampon influent sur la surface des clochers, surtout ceux possédant le même signe électrique que la protéine, et d'autant plus qu'ils sont plus rapides; aussi les tampons utilisés renferment-ils généralement l'acide diéthylbarbiturique, qui est assez lent. Enfin, lorsque deux protéines de mobilité différente migrent au sein d'une même solution, la proportion que l'on calcule pour la fraction la plus rapide est systématiquement entachée d'une erreur par excès, tandis que pour la fraction la plus lente, on aboutit à une erreur par défaut [24, 132]. Les proportions exactes des protéines ne peuvent être déterminées par la simple mesure des aires des différents pics et le calcul des concentrations relatives des différents composants directement à partir d'un unique diagramme. Pour obtenir une estimation précise de la concentration d'un composant électrophorétique, on doit faire une série de mesures à différentes forces ioniques et à différentes concentrations en protéines et déterminer graphiquement la concentration apparente de chaque constituant en fonction du rapport concentration en protéines/force ionique. L'extrapolation à valeur nulle donne alors une estimation précise de la quantité de composant présent [voir 26].

Il n'est naturellement pas nécessaire d'utiliser un tel procédé dans les mesures électrophorétiques habituelles, et il suffit, pour les besoins cliniques, de comparer les aires des différents pics avec celles données par l'étude d'un échantillon normal, faite dans les mêmes conditions standard.

Pour qu'une protéine puisse être considérée comme électrophorétiquement homogène, deux conditions doivent être réunies : il faut que la frontière reste unique dans un champ électrique, quels que soient la durée de l'expérience, la force ionique du tampon et le *p*H de la solution; il faut encore

que la frontière ne s'élargisse pas plus vite pendant l'électrophorèse qu'elle ne s'élargit par simple diffusion dans une expérience témoin où elle ne subit pas l'action d'un champ électrique.

Nous ne saurions trop souligner le fait que lorsqu'une fraction se révèle homogène à l'électrophorèse, on ne doit pas en conclure que l'on a affaire à une protéine pure; tout au plus peut-on dire que l'on a affaire à des protéines présentant la même mobilité dans un champ électrique; on voit par là combien sont incorrectes des appellations comme *la* globuline β ou *la* globuline γ. C'est ainsi, pour n'en citer qu'un exemple, que le pic électrophorétique correspondant à la β_1-globuline inclut des composants qui sont chimiquement très différents, tels la β_1-lipoprotéine, qui renferme 76 p. 100 de lipides, et la sidérophiline ou transferrine, qui ne contient pas du tout de lipides. Pour qu'une protéine puisse être considérée comme bien définie, il faut qu'elle réponde également aux autres critères d'homogénéité connus, ultracentrifugation et surtout critère de solubilité.

On sait combien les cliniciens ont su tirer de précieux renseignements de l'étude des diagrammes obtenus en soumettant le sérum entier à l'électrophorèse et en étudiant les variations pathologiques des diagrammes établis dans des conditions standard comme moyen de diagnostic, sans chercher à obtenir des conclusions quantitatives très précises. Mais l'appareil de Tiselius, avec l'équipement optique nécessaire, est onéreux; de plus, la dialyse préalable du sérum est longue et les diverses manipulations sont délicates. Or, seules des variations de grande amplitude des fractions protéiques sont importantes en clinique; on pouvait donc espérer disposer d'une technique plus rapide et moins onéreuse, même au prix d'une diminution de la sensibilité et de la précision. Tiselius lui-même [17, 70] proposa une technique simplifiée fondée sur le déplacement électrophorétique des protéines au sein d'une bande de papier-filtre; Durrum réalisa un appareil d'emploi commode [25]; Machebœuf et ses élèves firent beaucoup pour le développement de cette technique [voir 81]. C'est la microélectrophorèse sur papier.

B. — Microélectrophorèse sur papier

Cette technique est devenue maintenant d'un emploi extrêmement fréquent et d'une utilisation banale dans l'étude des protéines sériques; aussi nous bornerons-nous à rappeler quelques notions de base sur ce point [voir 81, 56, 45].

L'électrophorèse sur papier représente un cas particulier de l'électrophorèse sur support solide (*). Le principe consiste, nous le savons, à faire migrer les différentes fractions protéiques le long d'une bande de papier-filtre imprégnée d'une solution d'électrolytes, à *p*H 8,6 le plus souvent. Deux électrodes de platine permettent le passage du courant électrique dans la solution; il y a avantage à avoir une tension très forte et une intensité très faible, ce qui réduit les phénomènes d'évaporation : 110 à 300 volts et 2 à 5 milliampères correspondent à une moyenne convenable.

Après passage du courant, on procède à la fixation des protéines sur le papier par un ou plusieurs agents coagulants (acide acétique, bichlorure de mercure, méthanol) et à leur révélation à l'aide d'un colorant convenable. Les deux colorants les plus utilisés pour la coloration des protéines sériques sont le bleu de bromophénol et l'amidoschwarz; l'affinité tinctoriale des diverses fractions protéiques vis-à-vis du second est plus régulière que celle vis-à-vis du premier : l'affinité des albumines pour le bleu de bromophénol est en effet 1,6 fois celle des globulines.

L'utilisation de colorants différents a permis à la microélectrophorèse sur papier de se révéler supérieure à l'électrophorèse en cellule dans l'isolement de certaines cénapses : on dispose ainsi maintenant de procédés permettant l'identification semi-quantitative des lipoprotéines ou des glucoprotéines par exemple [voir 45].

Comment étudier l'électrophorégramme obtenu ? Comment apprécier les différences pouvant exister entre les sérums pathologiques et le sérum normal ? Voilà un problème qui a suscité de vives controverses. D'aucuns, comme Macheboeuf [81], prétendent que la fixation d'un colorant, même l'amidoschwarz, n'étant pas identique sur toutes les fractions protéiques d'un sérum normal et devenant encore plus irrégulière dans le cas de sérums pathologiques [65], toute donnée quantitative est illusoire et seul l'examen macroscopique, organoleptique pourrait-on dire, simultané d'un protéinogramme témoin et du protéinogramme étudié est à conseiller. Mais encore faut-il savoir apprécier les différences

---

(*) On a également préconisé comme support des plaques de gélose (voir p. 27) et plus récemment de gel d'amidon. Les fractions protéiques ainsi séparées sont un peu différentes et plus nombreuses que dans le cas de l'électrophorèse sur papier, surtout en opérant sur gélose.

entre les deux bandes colorées et l'Homme est ainsi fait qu'il préfère appuyer son jugement sur des chiffres alors même qu'il les sait faux, plutôt que de se contenter d'un résultat strictement qualitatif. Si l'on désire savoir quelle est la quantité de chacune des fractions protéiques qui ont été séparées par électrophorèse, le seul procédé exact est de repérer l'emplacement de ces fractions sur protéinogramme non coloré, grâce à un électrogramme identique réalisé simultanément et que l'on a coloré, puis de découper les rectangles de papier porteurs des fractions ainsi isolées; les protéines présentes dans chacun des rectangles seront alors éluées et dosées grâce à une méthode suffisamment sensible [voir 81]. Il est bien certain que cette façon de procéder complique considérablement la technique de la microélectrophorèse sur papier, si élégante par sa simplicité.

Aussi l'habitude s'est-elle instaurée de procéder à l'enregistrement des taches colorées se trouvant après révélation sur le protéinogramme. Pour cela, le papier est rendu transparent par immersion dans un mélange d'huile de paraffine et d'α-bromonaphtalène. A l'aide d'une cellule photoélectrique, on détermine la densité optique le long de la bande et on trace la courbe représentative des valeurs obtenues; on décompose la surface ainsi délimitée en un certain nombre de courbes en cloche, dites un peu abusivement courbes de Gauss, et qui sont analogues à celles que l'on obtient avec l'appareil de Tiselius. Au moyen d'un planimètre, on recherche la proportion des diverses fractions; on établit ainsi un pourcentage relatif des protéines sériques. En pratiquant un dosage des protéines totales, les pourcentages des différentes fractions sont convertis en quantités pondérales.

Telle est la technique, de beaucoup la plus utilisée aujourd'hui, d'examen d'un protéinogramme, et l'on ne conçoit pas, en clinique, un résultat d'étude de la protéinémie par microélectrophorèse sur papier qui ne soit donné en grammes de fractions protéiques par unité de volume de sérum après enregistrement optique du protéinogramme et calcul des surfaces des clochers obtenus. Il semble d'ailleurs que si l'on opère avec soin, les résultats ne diffèrent guère que de 10 p. 100 au plus de ceux qui sont fournis par la technique utilisant l'appareil de Tiselius; ce degré de précision est assurément très suffisant pour les besoins de la clinique et le tracé d'une courbe sur un papier est certainement d'un emploi plus commode que le protéinogramme lui-même, fragile et dont la

conservation dans un état parfait est difficile. Au cours de ces dernières années, de très nombreux chercheurs, partant de considérations théoriques ou d'observations expérimentales, se sont penchés sur les diverses étapes de la méthode, afin d'établir en détail le protocole opératoire le plus recommandable par sa simplicité, la reproductibilité et la précision des résultats obtenus [voir 45].

VI. — FRACTIONNEMENT PAR DES TECHNIQUES DIVERSES

Il existe, certes, d'autres techniques de fractionnement des protéines et l'on n'a pas manqué de les appliquer au sérum. Mais elles sont d'un emploi moins général que toutes celles dont nous avons parlé jusqu'ici, ou bien il s'agit de techniques relativement compliquées ou délicates et longues à réaliser, ce qui les rend difficilement applicables en médecine. Il est à remarquer, d'autre part, que les techniques de fractionnement envisagées dans ce dernier groupe sont en fait plutôt des techniques d'identification ou de dosage, dans la mesure où l'on ne recueille pas les « fractions » éventuellement isolées.

Dans le cadre des techniques de fractionnement spécialement adaptées à des fractions protéiques particulières, nous citerons celles qui utilisent les propriétés enzymatiques de certaines protéines, dont les applications médicales sont des plus importantes : l'on sait que l'on dose ainsi l'haptoglobine sérique grâce à sa propriété d'activation peroxydasique de l'hémoglobine et de même les phosphatases « alcaline » et « acide », la choline-estérase, etc., grâce à leurs propriétés enzymatiques spécifiques vis-à-vis de substrats appropriés. L'estimation semi-quantitative de la teneur du plasma en prothrombine est également une opération courante de biochimie clinique.

Si le fractionnement des protéines par ultrafiltration sur des membranes de porosité connue [34] est demeuré une technique de recherches peu souvent utilisée en clinique, le fractionnement par immunochimie semble particulièrement riche de promesses. Les réactions immunologiques ont, en effet, une spécificité et une sensibilité rarement atteintes par les réactifs chimiques habituels. Leur emploi permet de déceler des quantités minimes de substances et si, depuis longtemps, on se sert de ces réactions immunologiques dans divers

cas spéciaux, notamment en médecine légale, en physiologie comparée, en systématique ou en génétique, leur utilisation en médecine ne cesse de croître : c'est grâce à ces techniques que nous pourrons détecter, par exemple, les paraprotéines anormales qui apparaissent au cours de certaines plasmocytoses. De grands progrès dans les fractionnements immunochimiques ont été réalisés grâce à l'emploi de techniques quantitatives mises au point à la suite des travaux de Heidelberger et Kendall [48, 49, 46, 47, 53, voir 35]. Il est maintenant possible de doser d'une manière très précise la quantité d'anticorps présents dans un sérum ou la quantité d'antigène se trouvant dans une solution.

Le fractionnement immunochimique a vu encore augmenter ses possibilités avec l'introduction des techniques de réaction antigène-anticorps sur gélose proposées par Ouchterlony [98] et par Oudin [99] et développées par Grabar et ses élèves [60]. Un fractionnement absolument remarquable, d'une finesse et d'une sensibilité inégalées, peut être réalisé en combinant l'immunochimie sur gélose et l'électrophorèse sur gélose [voir 36].

CONCLUSIONS DU CHAPITRE PREMIER

Nous avons voulu dans les quelques pages qui précèdent indiquer sommairement les différents moyens que nous possédons actuellement pour fractionner les diverses protéines que l'on peut rencontrer dans un milieu biologique quelconque, et dans le sérum sanguin tout particulièrement. Il s'en faut encore de beaucoup que l'immense somme d'efforts mis en œuvre et l'ingéniosité apportée à la résolution de ce problème aient porté tous leurs fruits : à l'heure actuelle, rares sont encore les protéines sériques dont l'étude est assez avancée pour que l'isolement à l'état de pureté absolue soit possible. On doit se contenter, dans presque tous les cas, de fractions qui sont loin d'être des espèces chimiques définies. Aussi bien, les dénominations attribuées à ces fractions n'ont-elles de valeur que lorsque l'on précise rigoureusement les conditions de fractionnement qui ont permis de les obtenir. L'étude de leurs variations quantitatives rend cependant, depuis longtemps déjà, de grands services à la clinique.

CHAPITRE II

LES DYSPROTÉINÉMIES ET LEUR ÉTUDE

Si la quantité de protéines se trouvant dans le sérum d'un homme adulte normal est de l'ordre de 75 g par litre, ce chiffre peut être sujet à des variations physiologiques relativement importantes et parfois rapides : le simple fait de faire lever un individu qui était au repos couché suffit, par exemple, à modifier la teneur de son plasma en protéines totales [33, 94, 129]. La teneur du sang en diverses protéines est sous la dépendance d'hormones et spécialement d'hormones hypophysaires [11].

Le taux de la protéinémie dépend à la fois de la quantité totale des protéines en circulation et du volume du solvant qui les dissout. La protéinémie se trouve donc être la résultante de deux métabolismes : celui des protides et celui de l'eau et des sels. On conçoit dès lors les difficultés que l'on peut rencontrer dans l'interprétation de certaines dysprotéinémies, lorsque l'on sait que ces deux métabolismes ne sont nullement indépendants mais s'influencent réciproquement et subissent à des degrés divers la répercussion des autres métabolismes. D'autre part, l'interférence de ce métabolisme hydrominéral, qui modifie le volume sanguin, rend parfois délicate l'interprétation en elle-même de la protéinémie : on conçoit que la quantité totale de protéines en circulation puisse être modifiée (*protéinémie totale*); mais aussi qu'une hémoconcentration ou une hémodilution puisse amener une variation de la *protéinémie relative* dans un sens opposé. Théoriquement, les valeurs de la protéinémie peuvent renseigner sur l'état du métabolisme azoté quand le volume sanguin

n'est pas modifié et sur l'hydrémie sanguine lorsque ce métabolisme n'est pas perturbé. Malheureusement, il est rare de trouver des variations isolées de la nutrition azotée ou de la répartition des fluides. Aussi, la considération des valeurs de la seule protéinémie relative, envisagée comme guide clinique, bien que préconisée par certains auteurs, a-t-elle été fortement critiquée par ailleurs [voir 134]. Les mêmes critiques s'appliquent d'ailleurs à tout résultat d'analyse exprimé en concentration par unité de volume. Les mesures du volume sanguin, qui sont devenues maintenant facilement réalisables [112], permettent d'exprimer aisément les résultats en valeurs absolues.

Quelles sont les affections qui sont susceptibles de s'accompagner d'une modification quantitative de la protéinémie ?

Les résultats recueillis jusqu'ici permettent d'affirmer qu'une *modification quantitative* de quelque importance des protéines sériques s'accompagne en général d'une transformation sensible de la structure même de ces corps, c'est-à-dire d'une *modification qualitative*. Mais celle-ci à son tour entraîne un trouble pathologique du comportement fonctionnel des protéines, une dysfonction : c'est une *dysprotéinémie* au sens strict du terme; enfin, lorsque la modification structurale est devenue suffisamment importante, il apparaît dans le sang des protides véritablement étrangers à l'organisme, c'est-à-dire une *paraprotéinémie*. Le sens du terme « dysprotéinémie » a vu actuellement s'étendre son acception primitive et l'on en arrive à désigner ainsi, un peu abusivement peut-être, toute modification de la répartition du « spectre » des protéines sériques.

I. — LES DYSPROTÉINÉMIES

Nous envisagerons successivement et brièvement les origines des modifications de la protéinémie dans le sens d'un abaissement, puis d'une augmentation.

A. — Les hypoprotéinémies

On trouvera une étude détaillée des hypoprotéinémies dans une revue de Tayeau et Neuzil [134]. Nous nous bornerons à indiquer ici que l'on peut les diviser en deux groupes :

1° Les hypoprotéinémies secondaires à une dilution sanguine, donc essentiellement relatives.

2° Les hypoprotéinémies primitives par suite de perturbations du métabolisme des protéines. Elles portent principalement sur la fraction albumines et peuvent ressortir à des origines très diverses : troubles du métabolisme des protéines par insuffisance d'apport protidique (carence alimentaire quantitative ou qualitative, troubles digestifs) ou par troubles dans la synthèse des protéines (troubles hépatiques tout particulièrement), ou par déperdition exagérée de protéines, que celle-ci soit chronique (mal de Bright, néphroses, affections digestives hémorragiques, ponction d'épanchements séreux riches en protéines, catabolisme protidique exagéré, etc.), ou bien qu'elle se produise brutalement (hémorragie massive, choc traumatique, brûlures étendues, etc.).

B. — Les hyperprotéinémies

De tels états, où le taux de protéines est supérieur à 85 g par litre, sont beaucoup plus rares que les affections allant de pair avec une diminution de ces substances. Ils ont été passés en revue dans un article de Löffler, Wuhrmann et Wunderly [74]. Une remarque générale s'impose : si les diminutions du taux des protéines sériques sont pratiquement toujours dues à une diminution de la fraction albuminique, les globulines seules sont responsables de l'hyperprotéinémie. Mais toute modification du spectre des protéines sériques, même lorsqu'elle n'intéresse au début qu'une seule fraction, se répercute nécessairement sur l'ensemble des constituants protéiques : un mécanisme inverse et unilatéral de régulation de l'équilibre albumines-globulines fait que les albumines semblent devoir s'adapter et assurer une certaine compensation du taux des globulines et que toute hyperprotéinémie comporte dans la plupart des cas une certaine hypoalbuminémie, sauf peut-être dans la maladie de Kahler. Encore faut-il remarquer que, même dans cette affection où la protéinémie peut atteindre le double de la valeur normale, on n'observe jamais la moindre hyperalbuminémie.

En dehors des hyperprotéinémies secondaires consécutives à une déshydratation de l'organisme entraînant une hémoconcentration (vomissements ou diarrhées prolongées ou intenses), on peut classer les hyperprotéinémies en deux groupes : celles qui sont consécutives à des inflammations chroniques, traduisant des phénomènes d'immunité active et portant essentiellement sur la fraction γ-globulinique (maladie

de Nicolas-Favre, endocardite, tuberculose pulmonaire, infections chroniques des voies biliaires, maladies parasitaires tropicales), et celles dites essentielles qui accompagnent certaines entités morbides relativement rares et encore mal connues; ces dernières semblent être parfois en relation étroite avec des néoformations malignes telles que certaines formes extrêmement rares de leucémie et surtout le myélome multiple des os, encore appelé plasmocytome ou maladie de Kahler. Dans d'autres cas, l'hyperglobulinémie accompagne une infiltration par des cellules lymphoplasmocytaires non malignes cytologiquement et va de pair avec une très longue évolution clinique de la maladie : c'est en particulier ce qui se passe au cours de la macroglobulinémie ou maladie de Waldenström [144].

II. — MÉTHODES D'ÉTUDE DES DYSPROTÉINÉMIES

Il y a intérêt à étudier, non seulement les variations globales des protéines, mais surtout les variations séparées des fractions protéiques. Nous avons vu que les hypoprotéinémies sont toujours en fait des hypoalbuminémies, tandis que les hyperprotéinémies sont toujours dominées par une hyperglobulinémie. Dans un cas comme dans l'autre, le rapport albumines/globulines, qui est normalement de 1,5, se trouve abaissé.

On a souvent cherché à pratiquer la mesure du rapport albumines/globulines par relargage, mais les nombreuses techniques proposées donnent rarement des résultats égaux entre eux et identiques à ceux fournis par l'électrophorèse. On peut, tout au plus, considérer les chiffres obtenus comme des indices dont les variations peuvent aider au diagnostic de certaines affections. L'emploi de ces méthodes est de plus en plus abandonné depuis l'apparition de méthodes simplifiées d'électrophorèse.

L'électrophorèse indique la répartition moyenne suivante pour les différentes fractions du sérum humain normal :

Albumines		60 ± 5 p. 100
Globulines α_1	4 ± 1 p. 100	40 ± 3 p. 100
Globulines α_2	8 ± 2 p. 100	
Globulines β	12 ± 2 p. 100	
Globulines γ	16 ± 2 p. 100	

Notons qu'il est difficile de déterminer avec précision ces proportions relatives à partir d'électrophorégrammes. Dans le cas de la microélectrophorèse sur papier on se heurte à diverses causes d'erreurs, notamment la surcoloration relative de la sérum-albumine (voir p. 24) qui conduit donc à une estimation exagérée de cette fraction et d'autre part un effet de traînée de cette même catégorie de protéines, d'autant plus important en valeur relative que la concentration en protéines est plus faible [57, voir 45] et qui, au contraire, la fait sous-estimer. Dans le cas de l'électrophorèse en milieu liquide, on doit avoir recours à des précautions techniques particulières, que nous avons déjà signalées (voir p. 22). Les études les plus soigneuses [105, 3], réalisées dans ces conditions, indiquent qu'en moyenne 53 p. 100 des protéines du plasma humain normal ou 55 p. 100 des protéines sériques ont la mobilité de la sérum-albumine.

Certaines affections s'accompagnent d'une modification élective d'une fraction protidique particulière : c'est ainsi que dans la néphrose lipoïdique on voit augmenter les α et β-globulines, tandis que les albumines s'effondrent. Dans la maladie de Kahler, on observe une augmentation en général limitée à une seule fraction globulinique, ce qui permet de distinguer des myélomes α, β ou γ. Cet accroissement est dû à la présence d'une globuline anormale, qui se retrouve dans la majorité des cas dans les urines du malade sous forme de protéine de Bence-Jones; la globuline β_2M n'est ici en principe jamais fortement augmentée. Dans la maladie de Waldenström, c'est exactement le contraire qui se produit : dans ce syndrome, on assiste à une augmentation massive de la globuline physiologique β_2M. Certains états purpuriques avec hyperglobulinémie peuvent présenter des caractères mixtes, associant, par exemple, une hyper-γ-globulinémie à une augmentation modérée de la globuline β_2M, avec altération prononcée de leur comportement normal, pouvant se traduire par l'apparition d'une insolubilisation par refroidissement (cryoglobulinémie). Ces hyperglobulinémies nous montrent donc toute la gamme possible des modifications, depuis la simple modification quantitative du spectre protéique (dysprotéinémie) jusqu'à l'apparition de protéines ne correspondant à aucune fraction physiologique (paraprotéinémie) [voir 43].

Pour apprécier les variations quantitatives individuelles des diverses fractions protéiques, l'électrophorèse selon Tiselius

est très précieuse. La méthode, plus simple, de la microélectrophorèse sur papier suffit à la plupart des besoins de la clinique. Des techniques analytiques particulières permettent le dosage de l'haptoglobine qui est une globuline α_2, le dosage des phosphatases « alcaline » ou « acide », celui de la choline-estérase ou celui de la prothrombine.

En dehors de la microélectrophorèse sur papier, toutes ces techniques sont relativement délicates à mettre en œuvre et longues à réaliser. Aussi s'est-on efforcé de mettre au point des tests rapides permettant en définitive de détecter une modification portant aussi électivement que possible sur une fraction protidique presque toujours globulinique. Voici, brièvement présentés, les plus classiques d'entre eux :

A. — Méthode d'α-globulinométrie

Détermination de l'index résorcinique de Vernes [142]

Principe. — On ajoute au sérum une solution de résorcinol; les globulines α floculent et l'on effectue une mesure opacimétrique du trouble obtenu.

Mode opératoire. — La prise de sang doit être faite rigoureusement à jeun et le sérum conservé sur caillot jusqu'au moment de l'examen. On place dans deux tubes 0,8 ml de sérum absolument limpide. On ajoute 0,8 ml d'une solution de résorcinol à 1,25 p. 100 dans le premier tube, 0,8 ml d'eau physiologique dans le second. Les deux tubes sont bouchés et laissés quatre heures à la température de 20° C. On fait au bout de ce temps la mesure des densités optiques des deux solutions en lumière rouge. La différence des deux chiffres obtenus constitue l'index résorcinique du sérum étudié.

Résultats. — Normalement, l'index résorcinique est inférieur à 24 unités Vernes ou 100 unités Meunier. La zone pathologique va de 30 à 100 unités Vernes et plus.

B. — Méthodes de β-globulinométrie

1° Test au phénol de Kunkel [69]

Principe. — La dilution du sérum à l'aide d'une solution à 12 p. 100 de ClNa et 1 p. 100 de phénol entraîne l'insolubilisation de certaines lipoprotéines β.

Mécanisme de la réaction. — Le test au phénol décrit par KUNKEL pour évaluer les lipides du sérum intéresse en réalité seulement la fraction des lipoprotéines β_1. Il donne également un résultat positif avec la paraglobuline du myélome β. L'élimination des lipoprotéines β par agitation du sérum avec de l'éther contenant 8 p. 100 d'alcool entraîne une importante diminution de l'opacité.

Mode opératoire. — On mélange 0,1 ml de sérum et 1,8 ml de réactif préparé de la façon suivante :

ClNa	120 g
Phénol	10 g
Eau distillée, q. s. p.	1.000 ml

(On dissout le phénol dans de l'eau tiède, filtre et ajoute le chlorure de sodium. Le réactif doit être limpide et presque incolore. Il doit être contrôlé avant usage avec des sérums de sujets normaux et ne donner avec eux qu'une faible opacité inférieure à 25 unités Vernes.)

Après trente minutes, on détermine l'opacité au photomètre en lumière rouge.

Résultats. — Les sérums normaux donnent des chiffres compris entre 10 et 25 unités Vernes, soit 40 à 100 unités Meunier. La zone pathologique est située au-delà de 40 unités Vernes.

2° *Test au thymol de Maclagan* [85]

Principe. — La dilution du sérum par une solution saturée de thymol, tamponnée à *p*H 7,8, provoque la précipitation sélective de certaines fractions protéidiques.

Mécanisme de la réaction. — On sait que cette réaction a été découverte fortuitement dans le laboratoire de MACLAGAN, qui étudiait la réaction à l'or colloïdal comme test du fonctionnement hépatique. On fut amené à ajouter à la solution tampon à base d'acide diéthylbarbiturique utilisée dans cette technique quelques cristaux de thymol, afin d'en améliorer la conservation : on remarqua alors que certains sérums, qui donnaient une réaction à l'or colloïdal nettement positive, se troublaient au contact de cette solution thymolée. MACLAGAN étudia systématiquement ce phénomène; il précisa la zone optimum de *p*H pour l'apparition du trouble et constata qu'il s'agissait d'une réaction du groupe chimique des phénols et de leurs produits de substitution; il existe

pour ces différents corps une relation entre leur poids moléculaire, leur solubilité et leur pouvoir précipitant : la solubilité décroît plus rapidement que la concentration requise pour déterminer la précipitation. Dans ces conditions, le thymol s'avéra le corps le plus convenable à la réaction, étant juste suffisamment soluble pour produire un résultat satisfaisant en solution saturée. Bien que ce soit pour les *p*H de 5 à 6 que la réaction soit le plus marquée, Maclagan adopta le *p*H de 7,8, car c'est dans cette zone que la différenciation entre sérums normaux et sérums pathologiques est la plus nette, ainsi qu'avec une concentration ionique basse.

Nous serons bref sur le mécanisme fort complexe de cette réaction, bien étudiée dans différents articles et mémoires [27, 5, 59]. Dans le groupe général des réactions de labilité plasmatique quels sont les caractères propres à ce procédé ? Selon Maclagan, ce sont les γ-globulines qui sont responsables de cette réaction. Cependant, si l'on étudie, comme l'a fait Maclagan lui-même, la composition du précipité formé, on trouve qu'il s'agit d'un complexe protéino-phospholipidique thymolé renfermant presque un tiers de lipides. Cette quantité importante de cholestérol et de lécithines contenue dans le précipité fait soupçonner l'importance de leur rôle dans la réaction. Ce point est confirmé par diverses expériences réalisées à l'aide de sérums normaux et pathologiques délipidés : la présence de lipides de quelque origine qu'ils soient est nécessaire à la réaction au thymol. La pratique du test au thymol sur des fractions protéidiques isolées séparées par électrophorèse, ultracentrifugation ou relargage selon la technique de Cohn à l'éthanol montre que :

a) La fraction albumine ne joue qu'un rôle très secondaire dans la réaction; cependant, pour Maclagan et Bunn [voir 27], cette fraction interviendrait par ses perturbations qualitatives sinon quantitatives;

b) Les modifications quantitatives de la fraction γ-globulines jouent un rôle important mais non essentiel; là encore, pour Maclagan et Bunn [86], les modifications qualitatives seraient primordiales;

c) Les β-globulines et tout spécialement les β-lipoprotéines jouent le rôle essentiel ainsi que la lipoprotéine α_1.

Selon Cohen et Thompson [12], la spécificité la plus remarquable s'exercerait à l'égard d'une paraglobuline d'origine hépatique qui n'apparaît que lorsque le foie est le siège d'un processus de destruction parenchymateuse et migrerait à

l'électrophorèse avec les β-globulines; cette même paraprotéine élève l'index résorcinique de Vernes : il s'agit alors d'une fausse réaction de Vernes; pour la distinguer de la réaction due à la résorcidine, il faut pratiquer simultanément un dosage de l'haptoglobine : l'augmentation de la résorcidine est toujours associée à celle de l'haptoglobine, tandis que dans le cas d'une fausse réaction de Vernes, il existe une dissociation entre l'haptoglobine, qui est normale ou diminuée, et l'élévation de l'index résorcinique devenue parallèle à celle de l'index au thymol.

Nous verrons ultérieurement les conséquences du mécanisme de la réaction de Maclagan sur son utilisation comme moyen de diagnostic biologique (voir pp. 63 et 74).

Mode opératoire. — A 0,1 ml de sérum, on ajoute 6 ml de réactif préparé de la façon suivante : on réalise une solution tamponnée à *p*H 7,8 par dissolution dans un litre d'eau de 2,76 g de véronal, 2,06 g de véronal sodique et 6 g de thymol. Pour obtenir la dissolution on chauffe jusqu'à ébullition en agitant vigoureusement. On laisse refroidir; on ajoute au liquide trouble quelques petits cristaux de thymol pour l'ensemencer; on agite et laisse reposer une nuit à 20-25° C. Le réactif utilisé est le filtrat débarrassé de ses cristaux. Le *p*H doit être vérifié fréquemment et réajusté par addition de véronal ou de véronal sodique. Le réactif doit être conservé entre 20 et 25° C pour éviter sa précipitation.

Dans un autre tube à essais, on mélange la même quantité de sérum à 6 ml de solution tampon sans thymol. Après trente à soixante minutes, on détermine l'indice opacimétrique des deux solutions au photomètre en lumière rouge et on calcule la différence.

Une modification, due à Neefe [93], consiste à ajouter à l'appréciation immédiate de trouble (test de turbidité) celle de la précipitation tardive au bout de vingt-quatre heures (test de clarification). L'importance de cette précipitation peut être notée par une ou plusieurs croix. Ces deux façons d'apprécier l'intensité de la réaction se complètent et se contrôlent réciproquement [voir 27].

Résultats. — Un sérum normal, dans les conditions décrites ci-dessus, donne un index opacimétrique correspondant au plus à 6 unités Vernes, soit 25 unités Meunier. Pathologiquement, on obtient des valeurs de 10 à 100 unités Vernes et au-delà.

C. — Méthodes de γ-globulinométrie

1° *Test au sulfate de zinc de Kunkel* [68]

Principe. — On dilue le sérum avec une solution de sulfate de zinc à très faible force ionique, tamponnée à *p*H 7,6. Les γ-globulines floculent et on effectue une mesure opacimétrique du trouble obtenu.

Mécanisme de la réaction. — Il semble être particulièrement simple. Nous ne ferons que rapporter ici l'opinion de Demeulenaere et Wieme [20] : la réaction est spécifique des γ-globulines du sérum; elle n'est pratiquement pas influencée par les autres fractions protidiques : seules les albumines interviennent faiblement lorsque la concentration en γ-globulines est élevée.

Mode opératoire. — On introduit dans un tube à essais 0,10 ml de sérum et 6 ml de réactif de Kunkel préparé de la façon suivante :

$SO_4 Zn, 7 H_2O$	24 mg
Véronal	280 mg
Véronal sodique	210 mg
H_2O distillée	1.000 ml

On conserve la solution en glacière en flacons de 250 ml après avoir ajouté deux gouttes de toluène. Le réactif doit être prélevé par déversement, le *p*H de la solution doit être vérifié chaque jour, car il diminue spontanément, et réajusté par addition de véronal sodique.

Après trente minutes, on mesure l'opacité au photomètre avec un écran rouge (*).

Résultats. — Les sujets normaux donnent environ 25 unités Vernes, soit 100 unités Meunier; les valeurs pathologiques s'étendent de 30 à 100 unités Vernes et au-delà.

2° *Test au céphaline-cholestérol de Hanger* [41]

Principe. — Le sérum est dilué à l'aide d'une suspension aqueuse de céphaline et de cholestérol. L'existence dans le sérum de certaines fractions en quantité anormale provoque la floculation du réactif.

(*) La spécificité de ce test est telle que, selon Kunkel, il est possible, en utilisant l'équation suivante, de doser les globulines γ en grammes p. 100 à partir des résultats de l'opacimétrie exprimée en unités internationales (approximativement 1 unité internationale = 3 unités Vernes).

Globulines γ g p. 100 = (unités I. × 0,053) + 0,5.

Mécanisme de la réaction. — Il semble relativement simple. Selon Hanger, la positivité de la réaction peut résulter soit de l'augmentation des γ-globulines, soit de la diminution d'une certaine fraction de la sérum-albumine qui serait protectrice de la floculation et qui manquerait plus ou moins dans certains sérums. La réaction dépendrait donc non seulement d'un déséquilibre quantitatif entre les protéines, mais aussi de la disparition d'une sérum-albumine particulière, ce qui conférerait à la réaction une certaine spécificité.

Mode opératoire. — 0,2 ml de sérum sont dilués à 2 ml par addition d'eau physiologique. On ajoute un volume égal d'une émulsion aqueuse de céphaline et cholestérol. Après quarante-huit heures, on apprécie l'intensité de la floculation.

Résultats. — En quarante-huit heures, un sérum normal ne doit donner aucune floculation; les résultats pathologiques sont exprimés +, + +, + + +, + + + +, selon l'intensité de la floculation.

D. — Méthodes d'étude de la labilité colloïdale

Ces tests ne sont pas spécifiques des modifications portant sur une fraction protidique déterminée, mais leur positivité apparaît toutes les fois qu'une perturbation quelconque se produit dans le spectre des protéines sériques.

1° *Test au bichlorure de mercure de Gros* [38]

Principe. — L'addition au sérum d'une solution de bichlorure de mercure (liquide de Hayem) provoque une floculation irréversible et progressive des protéines du sérum.

Mécanisme de la réaction. — Il s'agit d'une forme moderne de la vieille réaction de Takata et Ara. Lors de l'addition de bichlorure de mercure au sérum, les globulines s'insolubilisent les premières et plus spécialement les γ-globulines. Les albumines exercent ici un effet protecteur considérable sur la floculation des globulines γ. En définitive, ainsi que Verschure [143] l'a montré, cette réaction est surtout fonction du rapport albumine/γ-globuline. Mais toute hypoalbuminémie ou toute hyperglobulinémie va se traduire par une modification des valeurs normales du test.

Mode opératoire. — On ajoute à 1 ml de sérum frais goutte à goutte, en agitant, du liquide de Hayem :

SO_4Na_2 anhydre	20 g
ClNa	10 g
Cl_2Hg	2,5 g
Eau distillée, q.s.p.	1.000 ml

On détermine la quantité minimum de réactif qui provoque l'apparition d'un trouble irréversible.

Résultats. — Un sérum normal doit donner un chiffre égal ou supérieur à 2 ml. Les chiffres pathologiques débutent à 1,7 ml.

2° *Test au sulfate de cadmium de Wunderly* [*151*]

Principe. — L'addition d'un réactif à base de sulfate de cadmium au sérum provoque la floculation de ce dernier lorsque le spectre de répartition de ses protéines est modifié.

Mécanisme de la réaction. — Il résulte des études électrophorétiques comparatives entreprises par les auteurs eux-mêmes [149] que la réaction est positive, non seulement en cas d'augmentation des globulines β ou γ ou de diminution de la sérum-albumine, mais aussi en présence d'hyperglobulinémie α, témoin habituel de l'infection. Il s'ensuit que la réaction de Wunderly, comme celle de Gros, est relativement peu spécifique. Selon Boselli [6], ce type de réaction est spécifique des euglobulines qui sont réparties sur les fractions électrophorétiques γ principalement, mais aussi sur les fractions β et α.

Mode opératoire. — A 0,4 ml de sérum on ajoute 0,2 ml du réactif suivant :

SO_4Cd, $8H_2O$	4 g
Eau distillée, q.s.p.	1.000 ml

Le test est positif si un trouble apparaît dans les cinq minutes suivantes empêchant de voir les barreaux d'une fenêtre à travers les tubes. On peut apprécier l'intensité du floculat et exprimer celle-ci de une à quatre croix.

Résultats. — Un sérum normal ne flocule pas dans les conditions opératoires décrites ci-dessus.

3° *Détermination de la fiche réticulo-endothéliale de Sandor*

Principe. — La diminution de la force ionique du sérum et une acidification progressive et modérée provoquent l'insolubilisation de certaines catégories de protéines (voir p. 15). La quantité de protéines ainsi précipitées et leur répartition sont différentes selon qu'il existe ou non une dysprotéinémie.

Mécanisme de la réaction. — Les protéines susceptibles de s'insolubiliser lorsque la force ionique devient suffisamment faible appartiennent par définition au groupe des *euglobulines*. La solubilité d'une protéine passant par un minimum au voisinage du point isoélectrique, chaque fois que par suite de l'acidification on se trouve au voisinage de son *p*H isoélectrique (ou isoionique puisque les sels minéraux sont en très petite quantité), une nouvelle fraction précipitera et pourra être isolée des autres protéines. Nous avons eu l'occasion de signaler que les euglobulines ainsi séparées appartiennent aux fractions électrophorétiques α_2, β_1 et β_2 (voir p. 15), associées à des γ-globulines. C'est donc le spectre de répartition de ces diverses fractions qui se trouve ainsi évalué et dans une certaine mesure l'ensemble de l'édifice protéique total du sérum qui est étudié, car une relation étroite paraît exister entre la composition et la répartition des protéines en général et celle des seules euglobulines [1, voir 124].

Mode opératoire [124. 125]. — 4 ml de sérum frais sont mis à dialyser pendant quarante-huit heures contre 2 l de tampon phosphate de Clark et Lubbs M/150 de pH 7,6. Si un précipité se forme au cours de cette dialyse, il est séparé et constitue la globuline I_1.

Les eaux mères sont diluées au quart à l'aide d'eau distillée, puis, au bout de quelques minutes, le *p*H est lentement amené à 5 à l'aide d'HCl N/20; on doit opérer par 9 ou 10 incréments équitablement répartis de 0,2 ou 0,3 unités *p*H. On recueille ainsi trois précipités correspondant aux *p*H de 6,6, 6,0 et 5,0. Le taux en est déterminé séparément, par dosage d'azote par exemple. On dresse alors un diagramme en portant en abscisses le *p*H et en ordonnées le rapport euglobulines précipitées/euglobulines totales insolubilisées. On définit ainsi une bandelette de précipitation dénommée fiche réticulo-endothéliale.

Résultats [121, 122, 125]. — La zone de précipitation de *p*H 7,2 à *p*H 6,6 correspond à l'euglobuline I, dite euglobuline

alcaline (β_2-euglobuline après purification); celle de *p*H 6,6 à *p*H 6,0 correspond à l'euglobuline II (β_1-euglobuline après purification); celle de *p*H 6,0 à *p*H 5,0 correspond à l'euglobuline III, dite euglobuline acide (α_2-euglobuline extrêmement riche en lipides après purification). Un sérum normal fournit les pourcentages de précipitation suivants : à *p*H 6,6, 40 à 55 p. 100; à *p*H 6,0, 60 à 80 p. 100.

L'euglobuline I_1, qui précipite parfois lors de la dialyse préliminaire, constitue une donnée totalement indépendante. Son taux normal est inférieur à 0,6 g par litre de sérum. Les augmentations traduiraient l'hyperplasie ou l'hyperfonctionnement d'une lignée particulière du système réticulo-endothélial, probablement celle à laquelle appartiennent les cellules de Küppfer (hépatites épidémiques, cirrhoses post-ictériques, etc.). Il s'agit d'une famille de γ-euglobulines particulières et entièrement pathologiques, dont la surproduction résulterait d'une irritation des systèmes macrophagiques puissants du foie et de la rate et représenterait le protoplasme désagrégé des macrophages.

Un diagramme « alcalinisé » avec accroissement anormal de l'euglobuline I se rencontre au cours des hypertrophies du système réticulo-endothélial (cirrhoses, myxœdème, maladie de Kahler). L'euglobuline III peut être normale ou diminuée, voire même absente.

On observe, au contraire, un diagramme « acidifié » avec disparition des euglobulines précipitant au *p*H supérieur en cas d'aplasie ou de blocage du S. R. E. La précipitation peut même ne commencer qu'au-dessous de *p*H 6. Un tel diagramme est donné par la néphrose lipoïdique, certaines néphrites et diverses affections s'accompagnant d'un trouble du métabolisme des substances lipidiques avec hyperlipidémie.

La détermination du taux de l'euglobuline I_1 et l'étude de la fiche réticulo-endothéliale constituent un test physio-pathologique sensible et précis qui n'est exactement comparable à aucun autre. Les modifications pathologiques semblent bien refléter une véritable expression quantitative d'un déséquilibre humoral. Malheureusement il s'agit là d'une technique fort longue et assurément beaucoup plus délicate à mettre en œuvre que les tests simples et rapides précédemment décrits.

Aussi diverses techniques ont-elles été établies, qui se proposent d'allier une grande simplicité opératoire à une sensi-

bilité conservée. Mentionnons en particulier celles de Vargues [138, 139, 140]. Elles consistent schématiquement à ajouter une très faible quantité de sérum à une série de solutions tampons de force ionique réduite et de *p*H compris entre 7,6 et 4,5. Les dilutions sériques ainsi réalisées sont agitées. Après quelques minutes, on détermine les quantités d'euglobulines précipitées par dosage opacimétrique. Sur un graphique on porte alors en abscisses les valeurs du *p*H et en ordonnées la densité optique. On relie par une courbe les points expérimentaux obtenus.

On obtient normalement une courbe en cloche dont le maximum se trouve vers *p*H 5,5 à 6,0. Cette courbe de précipitation des euglobulines en fonction du *p*H correspond à la fiche réticulo-endothéliale du sérum : l'euglobuline I_1 précipite dans le premier ou le second tube; l'euglobuline I précipite au-dessus de *p*H 6,5; l'euglobuline II s'insolubilise entre *p*H 6,5 et *p*H 5,5; l'euglobuline III, enfin, apparaît au-dessous de ce dernier *p*H.

*
**

Quel peut être l'appui que ces différents tests de dysprotéinémie assurent au clinicien dans l'établissement de son diagnostic ?

L'interprétation des résultats d'une réaction biologique est d'autant plus difficile que le nombre de facteurs en jeu est plus grand. La réaction idéale est celle qui ne dépend que d'un seul facteur : à chaque valeur de ce facteur correspond un résultat déterminé de la réaction, la relation linéaire étant la plus maniable. A ce point de vue, il est évident qu'un test de dysprotéinémie comme celui de Kunkel au sulfate de zinc, par exemple, est supérieur au test de Maclagan et encore plus à celui de Gros.

Mais, d'un autre côté, tout état pathologique susceptible de retentir sur les protéines sériques ne le fera jamais exclusivement sur une fraction déterminée, mais sur un certain nombre d'entre elles. D'où la nécessité, pour aider efficacement au diagnostic, de multiplier le nombre de ces tests, plus ou moins spécifiques au point de vue biochimique, mais tout à fait aspécifiques au point de vue clinique, de les associer et de les combiner. Et cela explique que l'on réalise aujourd'hui sur un même sérum, ces batteries de tests, ces constellations de tests, d'autant plus qu'un test donné, quelle que soit son

« excellence » statistique, peut toujours se trouver défaillant dans un cas particulier déterminé (*).

Il peut arriver qu'une réaction, en perdant de sa spécificité biochimique, voit augmenter sa spécificité clinique : un cas typique est celui de la réaction de Maclagan, certainement sensible à des facteurs différents; mais il se trouve que certains troubles hépatiques s'accompagnent de variations portant justement sur ces facteurs et s'objectivent donc remarquablement par le test au thymol; cela ne signifie point, d'ailleurs, que tout thymol-test positif relève obligatoirement d'une étiologie hépatique.

Ce type de réaction, de spécificité en quelque sorte nuancée, semble devoir se révéler particulièrement intéressant, pour autant tout au moins qu'il soit possible de faire correspondre à une maladie donnée un « syndrome biochimique » constant et suffisamment marqué. Aussi, des travaux antérieurs [58, 88], ayant montré que l'addition au sérum sanguin, dans certaines conditions, d'une solution de molybdate d'ammonium, provoque l'insolubilisation des globulines de mobilité électrophorétique β et γ, nous avons cherché à utiliser ce fait pour la mise en évidence de dysprotéinémies diverses.

Ce sont ces essais que nous allons présenter dans les chapitres suivants et qui font l'objet de notre thèse.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Au cours de ce chapitre, nous avons indiqué les valeurs normales des différentes protéines sériques, puis nous avons passé en revue les causes principales de leurs variations pathologiques.

Nous avons rappelé les principaux procédés destinés à mettre en évidence les dysprotéinémies, insistant tout spécialement sur les tests rapides si souvent mis en œuvre dans ce but. Nous avons exposé les mécanismes propres à chacune de ces réactions et dégagé les critères qui permettent d'en apprécier la valeur. Des expériences antérieures sur l'action du molybdate d'ammonium vis-à-vis des protéines sériques nous ont semblé pouvoir être adaptées à l'élaboration d'un test intéressant pour l'étude de certaines dysprotéinémies.

(*) Bien d'autres réactions que celles que nous avons décrites ont été proposées, afin de mettre en évidence une modification pathologique des diverses fractions protéidiques du plasma ou du sérum. Mentionnons celles de Gaté et Papacostas, de Weltmann [voir 150, 74], de Popper et de la Huerga, etc. La comparaison de ces différentes épreuves fournit toujours des conclusions fructueuses [voir 149].

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

CHAPITRE PREMIER

ACTION DU MOLYBDATE D'AMMONIUM SUR LES PROTÉINES SÉRIQUES

Au cours de recherches antérieures [88], nous avons été amené à étudier l'action du paramolybdate d'ammonium sur les protéines sériques (*). Les résultats que nous avons obtenus ont constitué le point de départ des recherches que nous nous sommes proposé de rapporter ici. Nous résumerons dans ce premier chapitre les différentes notions acquises à la suite de ces précédents travaux.

1° *L'addition de molybdate d'ammonium* à du sérum sanguin, ainsi qu'à des euglobulines ou pseudoglobulines sériques préparées grâce aux techniques d'Hofmeister [51] et de Marcus [87], *entraîne l'insolubilisation d'une partie des protéines* se trouvant dans les solutions étudiées. Aucun précipité ne se forme, au contraire, lorsque ce sel est ajouté à une solution de sérum-albumine. De même, l'addition au sérum ou à la solution des diverses fractions protéidiques d'une solution de molybdate préalablement neutralisée à l'aide d'ammoniaque ne provoque l'apparition d'aucun précipité. La faible acidité des solutions de molybdate d'ammonium ne

(*) La détermination de la structure chimique exacte de ce sel a été fort délicate à réaliser. On tend actuellement à lui attribuer la formule $Mo_7O_{24}(NH_4)_6$, $4H_2O$ que l'on écrit encore $7MoO_3$, $3(NH_4)_2O$, $4H_2O$; pour diverses raisons, elle semble préférable à la formule de Rosenheim $12MoO_3$, $5(NH_4)_2O$, $7H_2O$.

On trouvera de plus amples détails sur la chimie des molybdates et en particulier des molybdates d'ammonium, ainsi que sur le comportement de ces derniers en solution aqueuse, dans divers ouvrages [55, 58, 63].

saurait cependant être rendue à elle seule responsable de l'insolubilisation observée, car l'addition au sérum ou aux diverses solutions protéidiques d'une solution d'acide chlorhydrique de manière à amener le *p*H à 5,0 n'entraîne la formation d'aucun précipité (*).

2° Lorsque l'on étudie *l'importance de la précipitation des protéines en fonction de la concentration du milieu en molybdate d'ammonium,* on est surpris d'observer dans toutes les expériences un maximum de précipitation très net, correspondant à un optimum en sel. Il est rare, en effet, lorsque l'on étudie la précipitation d'une solution protéidique en fonction de la concentration saline d'observer à partir d'une certaine concentration en sel une redissolution des protéines.

Nous nous sommes demandé si l'étude du *p*H du milieu ne serait pas susceptible de nous donner quelque éclaircissement sur ce phénomène. Effectivement, la courbe représentative des variations du *p*H en fonction de la quantité de molybdate ajoutée se montre exactement opposée à celle qui représente les quantités de protéines insolubilisées.

Voici, à titre d'exemple, les résultats obtenus par addition d'une solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 à du sérum de Cheval dilué au dixième (tableau I et figure 5).

On voit que l'addition au sérum d'une quantité déterminée de solution de molybdate provoque une chute du *p*H, comme si, les protéines s'étant emparées de l'ion ammonium, de l'acide molybdique se trouvait mis en liberté. En présence d'un excès de molybdate, le *p*H du milieu tend vers celui de la solution de ce sel. On constate que la précipitation maximum correspond toujours à la zone voisine du *p*H le plus bas. En général, c'est l'échantillon qui suit celui dont le *p*H est le plus bas qui montre le précipité le plus abondant; ceci confirme l'influence non négligeable du sel lui-même.

Ces premiers résultats prouvent que le *p*H joue un rôle essentiel dans la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium.

Comment pouvons-nous interpréter les variations de *p*H qui se produisent lorsque l'on ajoute une solution de molybdate d'ammonium à une solution protéidique ? Nous avons pu y parvenir lorsque nous avons déterminé les variations

(*) Toutes les expériences rapportées dans ce travail ont été réalisées à une température voisine de 20° C. A des températures plus élevées, le pouvoir précipitant du molybdate d'ammonium est très fortement augmenté.

TABLEAU I

N. B. — Les mélanges où la précipitation est maximum et le p*H* minimum sont en caractères gras.

Volume (ml) de solution de molybdate d'ammonium a 5 p. 100 ajouté a 1 ml de solution protéidique.	Protéines précipitées (mg)	Protéines précipitées (p. 100)	*p*H des liquides surnageants
0	0	0	7,19
0,025	0	0	4,91
0,05	0,86	10	4,70
0,1	1,88	22	**4,63**
0,2	**2,10**	**25**	4,65
0,3	1,84	21	4,67
0,4	1,64	19	4,72
0,5	1,36	16	4,72
0,6	1,05	13	4,74
0,7	0,60	7,5	4,76
0,8	0,60	7,5	4,77
0,9	0,56	7	4,79
1,0	0,39	5	4,81

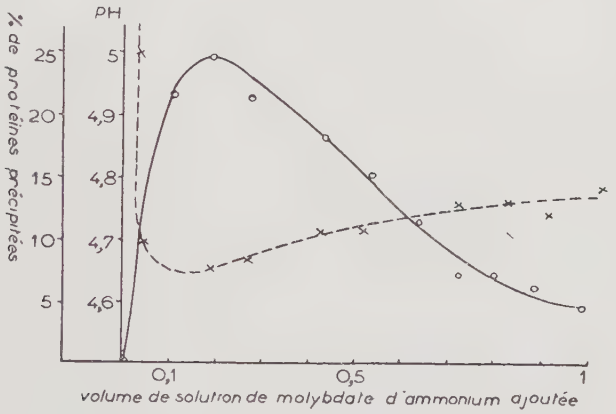

Fig. 5.

Courbes représentatives des variations du pourcentage de protéines précipitées (———) et des variations du *p*H (- - -.-) en fonction de la concentration en molybdate d'ammonium.

de *p*H d'une solution de molybdate en fonction de la concentration en sel : le *p*H des solutions dépend de leur concentration et varie, par exemple, de 4,50 à 5,30 lorsque la concentration passe de 0,125 à 5 p. 100.

Nous avons indiqué dans le tableau II le *p*H de solutions aqueuses de molybdate d'ammonium à divers titres.

TABLEAU II

Concentration de la solution en molybdate d'ammonium (p. 100)	*p*H
0	6,60
0,0125	4,30
0,025	4,35
0,0625	4,40
0,125	4,50
0,250	4,65
0,625	4,82
1,250	4,96
2,500	5,10
5,000	5,27

Ces faits expliquent les variations de *p*H constatées. En effet, dans la zone de très faible concentration en molybdate, la quantité de protéines présentes dans le mélange est relativement très importante par rapport à la quantité de molybdate. Aussi le *p*H du mélange est-il intermédiaire entre celui de la solution protidique et celui qu'aurait une solution aqueuse de molybdate d'ammonium à la concentration correspondante : aucun précipité n'apparaît dans ces conditions. Lorsque la concentration en molybdate augmente, l'excès relatif de protéines va diminuer et le *p*H, se rapprochant de celui qu'aurait une solution aqueuse de molybdate au titre correspondant, diminue aussi : une certaine quantité de protéines s'insolubilise. Pour une concentration en sel suffisante, le rôle des protéines devient relativement négligeable et le *p*H de ce mélange particulier est alors pratiquement identique à

celui d'une simple solution aqueuse de molybdate d'ammonium au même titre : ce mélange est justement celui qui, sur les courbes de *p*H, se trouve au point le plus bas et correspond à la zone de précipitation maximum des protéines. Enfin, lorsque la concentration en molybdate augmente encore, tout se passe comme si seul le sel intervenait sur le *p*H et la courbe de *p*H des mélanges protéines-molybdate est pratiquement superposable à la courbe des variations de *p*H du seul molybdate : le *p*H augmente et la quantité de protéines insolubilisées diminue lorsque la concentration en sel s'accroît.

Ces variations de *p*H peuvent être concrétisées par les courbes de la figure 6.

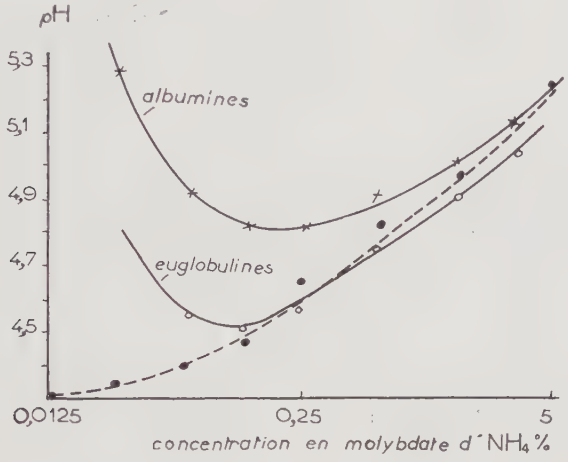

Fig. 6.

Courbes représentatives des variations du *p*H de mélanges protéines de Cheval - molybdate d'ammonium (———) et de solutions de molybdate d'ammonium seul (- - - -) en fonction de la concentration du milieu en molybdate.

3° Toutes proportions gardées, *le poids de protéines précipitées d'une solution par le molybdate d'ammonium se montre d'autant plus élevé que la dilution est plus grande :* les courbes de la figure 7 qui représentent les variations du pourcentage de protéines précipitées du sérum de Cheval plus ou moins dilué, en fonction de la concentration de la solution en molybdate d'ammonium, en rendent parfaitement compte [58].

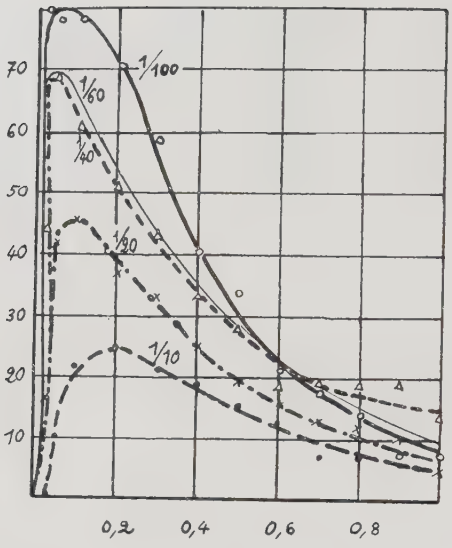

Fig. 7.

Courbes représentatives des variations du pourcentage de protéines précipitées du sérum de Cheval plus ou moins dilué, en fonction du volume de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 ajouté à 1 ml de solution protéidique (d'après Jolin [58]).

Comment peut-on expliquer cette action exercée par la dilution sur le phénomène ?

A notre avis, deux explications, qui ne s'excluent d'ailleurs nullement, peuvent être proposées.

Divers auteurs, et, en particulier, Mme Roche et ses collaborateurs [116, 117], ont insisté sur le rôle joué par la dilution dans la précipitation des protéines par les sels. On sait depuis longtemps [104] que les protéines d'un mélange exercent entre elles diverses interactions en fonction de la dilution du milieu. En milieu concentré, il se produit des associations entre les globulines et les albumines; il n'en est plus de même en milieu dilué. Or nous avons constaté que le molybdate n'exerce aucune action sur la précipitation des albumines sériques. Cependant, si l'on considère, comme nous le verrons plus loin, que les albumines n'interviennent que très peu dans l'insolubilisation des globulines par le sel, on peut penser que ce mécanisme, s'il existe, est d'importance fort secondaire.

D'autre part l'examen des *p*H montre que ceux-ci atteignent une valeur d'autant plus faible que la dilution de la solution protéidique est plus grande. Or, nous y reviendrons, les associations protéines-molybdate s'insolubilisent d'autant plus facilement que le *p*H du milieu est plus bas situé. Il semble, en définitive, que le rôle joué par la dilution sur la précipitation des protéines sériques doive être rattaché surtout à cet élément.

Quoi qu'il en soit, si l'on désire obtenir le maximum de protéines précipitées, lorsque l'on met en œuvre le molybdate d'ammonium, il est nécessaire de diluer le milieu.

Jusqu'à quel taux la dilution doit-elle être effectuée ? Il ressort de nos expériences que le taux de dilution minimum du sérum permettant d'obtenir le maximum de précipitation est de l'orde de 1/80, ce qui représente une concentration en protéines voisine de 1 p. 1.000.

Nous avons étudié l'action précipitante du molybdate d'ammonium (solution à 5 p. 100) sur des fractions protéidiques isolées du sérum de Cheval grâce aux techniques de Hofmeister [51] et de Marcus [87]. L'examen des résultats montre qu'ici encore le maximum de précipitation s'explique par les variations de *p*H du milieu et que le taux d'insolubilisation dépend de la concentration en protéines.

Dans le cas des pseudoglobulines, nous avons obtenu un pourcentage maximum de protéines précipitées qui varie entre 75 p. 100 pour la concentration de 10 p. 1.000 et 89 p. 100 pour la concentration de 2,6 p. 1.000. Ce fait s'explique fort bien lorsque l'on considère que la fraction pseudoglobulines, préparée suivant la technique de Marcus [87], contient toujours des quantités notables d'albumines [77, 133]. Il se forme donc des associations pseudoglobulines-albumines d'autant plus abondantes que la solution est plus concentrée.

Il n'en est plus de même pour les euglobulines, qui, dans le cas du Cheval, correspondent à des γ-globulines presque pures [133]. Dans ce cas, la dilution de la solution n'intervient que très peu sur le pourcentage maximum de protéines précipitées (de 90 p. 100 pour la concentration de 10 p. 1.000 à 93 p. 100 pour la concentration de 2,6 p. 1.000). On peut donc conclure que le molybdate d'ammonium à une concentration convenable, qui dépend de la concentration en protéines de la solution, précipite la presque totalité des euglobulines du sérum.

Ces résultats seront confirmés par l'étude des diagrammes électrophorétiques des protéines sériques précipitées par le molybdate d'ammonium.

4° *Le maximum de précipité obtenu* pour chaque taux de dilution *correspond à des quantités de molybdate variables.* Cette constatation montre la différence qui existe entre le molybdate et d'autres réactifs utilisés pour la précipitation des protéines sériques, comme le sulfate d'ammonium, par exemple : avec ce dernier sel, les globulines précipitent à demi-saturation, et cela quelle que soit la concentration du milieu en protéines, jusqu'à une certaine valeur toutefois.

Cette propriété particulière est en faveur de la formation d'un complexe protéines-molybdate d'ammonium : lorsque le milieu est pauvre en protéines, le *p*H minimum et le précipité le plus abondant apparaissent pour une faible concentration en molybdate; l'inverse se produit avec des concentrations en protéines plus élevées. Les courbes de la figure 7 illustrent ce phénomène.

5° Nous avons étudié *la nature électrophorétique des protéines précipitées* au sein d'un sérum par addition de molybdate d'ammonium. L'électrophorèse sur papier du précipité obtenu par addition du dixième de son volume d'une solution de molybdate à 5 p. 100 à du sérum de Cheval dilué au dixième nous a montré qu'il contient surtout des γ-globulines, une grande quantité de β-globulines et seulement des traces d'α-globulines et d'albumines inévitablement entraînées avec les β et γ-globulines. L'enregistrement optique du diagramme électrophorétique obtenu est représenté par la figure 8 (*); l'étude de la surface des clochers constitutifs indique que l'ensemble des globulines β et γ constitue 84 p. 100 du précipité protéique total. Ces résultats ont été ultérieurement confirmés par Astrup [4], qui a étudié la précipitation sélective des protéines sériques par différents anions.

L'électrophorèse parallèle du liquide surnageant ne nous a pas révélé de modification sensible des albumines et des globulines α, une très forte diminution des β-globulines et une quasi-disparition des γ-globulines. Ces résultats sont illustrés par l'enregistrement optique du diagramme électrophorétique représenté par la figure 9 : il ne reste plus dans le liquide surnageant que 8 p. 100 de β et γ-globulines.

(*) L'enregistrement optique de nos électrophorégrammes a été réalisé à l'aide d'un appareil *Titromatic*, J. Quéré, constructeur, Bordeaux.

6° En ajoutant une solution de molybdate d'ammonium à du sérum sanguin ou à des solutions des fractions protéiques du sérum, on peut, en amenant le milieu à un *p*H déterminé à l'aide d'acide chlorhydrique dilué, obtenir la précipitation totale des protéines contenues dans la solution traitée.

Fig. 8.

Enregistrement optique du protéinogramme du précipité obtenu par addition de molybdate d'ammonium à du sérum de Cheval.

Fig. 9.

Enregistrement optique du protéinogramme du liquide surnageant obtenu après addition de molybdate d'ammonium à du sérum de Cheval.

A la suite de diverses expériences, nous avons pu déterminer *les limites de pH correspondant au début d'insolubilisation et à la précipitation totale.* Nous avons obtenu les chiffres suivants (tableau III) avec du sérum de Cheval et des fractions protéidiques isolées de sérum de Cheval, à la concentration de 4 p. 1.000 et additionnés de 0,25 ml de solution de molybdate d'ammonium à 4 p. 100 par millilitre de solution protéidique.

Le *p*H d'insolubilisation est donc situé d'autant plus bas, lorsque l'on considère les différentes fractions protéidiques, que l'effet précipitant exercé par le molybdate se fait moins

TABLEAU III

Fraction protéidique	*p*H de début d'insolubilisation	*p*H de précipitation totale
Euglobulines	5,7	4,9
Pseudoglobulines	5,5	4,7
Albumines	5,0	4,6
Sérum total	5,5	4,6

sentir et que le *p*H isoélectrique de la fraction est lui-même plus bas.

Cette constatation est intéressante, car elle montre que le molybdate d'ammonium se conduit, dans ce cas, vis-à-vis des protéines sériques comme la plupart des sels utilisés pour leur fractionnement : si, en effet, on ajoute au sérum une petite quantité de sulfate d'ammonium et que l'on trace la courbe de précipitation des protéines en fonction du *p*H, on constate que, pour obtenir le maximum de protéines précipitées, il faut se placer à un *p*H d'autant plus acide que la fraction envisagée présente un point isoélectrique plus bas.

Cette observation apporte, d'autre part, un argument en faveur de notre interprétation des faits que nous avons précédemment rapportés : nous avons insisté sur l'aspect imprévu présenté par la courbe de précipitation des protéines sériques en fonction de la concentration du milieu en molybdate, cette courbe présentant, en effet, un maximum net; or nous avons indiqué que ce maximum devait être rattaché aux variations de *p*H du milieu apportées par la réaction entre les protéines et le molybdate.

7° Nous avons déjà dit que certains des résultats que nous avons obtenus, et particulièrement le déplacement du maximum de précipitation lorsque la concentration en protéines varie, sont en faveur de *l'existence de combinaisons entre les protéines sériques* d'une part et *le molybdate d'ammonium* d'autre part. Grâce à des *mesures d'électrotitration*, il nous a été permis de vérifier le bien-fondé de notre conception.

Nous avons utilisé pour nos essais la fraction « albumines » qui présente l'avantage d'être soluble dans les solutions de

molybdate. Notre protocole expérimental a consisté à prendre trois solutions :

— La première, constituée par 2 ml de solution de sérum-albumine à 8 mg par millilitre;

— La seconde, constituée par un mélange de 0,2 ml de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 et de 2 ml d'eau distillée;

— La troisième, constituée par un mélange de 0,2 ml de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 et de 2 ml de solution de sérum-albumine à 8 mg par millilitre.

Nous avons amené chacune de ces trois solutions à *p*H 5,10 exactement, puis nous avons déterminé la quantité de OHNa

TABLEAU IV

VOLUMES DE OHNa 0,01 N AJOUTÉS						(x+y)—z
A LA SOLUTION DE SÉRUM-ALBUMINE (x ml)	*p*H	A LA SOLUTION DE MOLYBDATE D'AMMONIUM (y ml)	*p*H	AU MÉLANGE DE SÉRUM-ALBUMINE ET DE MOLYBDATE D'AMMONIUM (z ml)	*p*H	
0	5,09	0	5,10	0	5,10	»
0,01	5,13	0,20	5,12	0,10	5,14	0,11
0,02	5,13	0,40	5,13	0,20	5,15	0,22
0,04	5,23	1,00	5,16	0,50	5,18	0,54
0,05	5,23	2,00	5,23	1,00	5,22	1,05
0,09	5,30	3,20	5,30	1,50	5,30	1,79
0,10	5,33	4,00	5,36	2,00	5,36	2,10
0,12	5,40	4,20	5,39	2,20	5,39	2,12
0,14	5,43	4,40	5,45	2,50	5,45	2,04
0,22	5,60	4,60	5,61	2,90	5,63	1,92
0,28	5,86	4,70	5,90	3,10	5,85	1,88
0,34	6,14	4,75	6,18	3,20	6,20	1,89
0,44	6,60	4,82	6,59	3,30	6,60	1,96
0,50	6,80	4,85	6,80	3,35	6,81	2,00
0,55	6,99	4,88	7,07	3,40	7,00	2,03

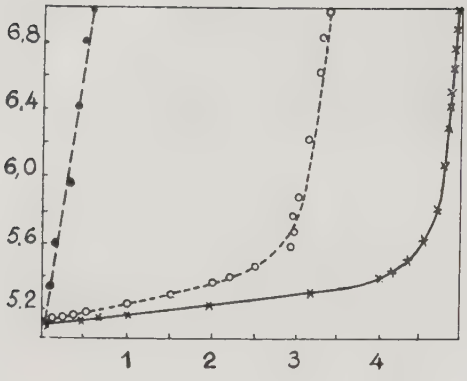

Fig. 10.

Courbes représentatives des variations du *p*H d'une solution d'albumines (•), d'une solution de molybdate d'ammonium (x) et d'une solution mixte albumines-molybdate (°) en fonction de la quantité de soude ajoutée. — Abscisses = millilitres; ordonnées = *p*H.

0,01 N nécessaire pour élever le *p*H de chacune de ces solutions à *p*H 7,00.

Le tableau IV résume les résultats que nous avons obtenus; ils sont concrétisés par les courbes de la figure 10.

Nous voyons que le mélange de molybdate d'ammonium et de protéines provoque une consommation d'ions hydrogène; il se forme donc une combinaison électrovalentielle entre les deux constituants du mélange (*). Cette combinaison est entièrement constituée pour un *p*H de 5,30-5,35 et se maintient au moins jusqu'à *p*H 7,0. En effet, la différence entre les valeurs indiquées dans le cas du mélange albumines-molybdate et celles correspondant à la somme des volumes nécessaires pour neutraliser séparément les protéines et le sel conserve toujours la même importance entre *p*H 5,3 et *p*H 7. Si l'on se reporte aux courbes de *p*H que nous avons établies pour les mélanges de molybdate d'ammonium et de protéines sériques, on voit que les *p*H de ces mélanges se trouvent justement dans la zone de formation de cette combinaison électrovalentielle.

(*) Pavolini [101] aurait mis en évidence la formation de complexes entre le molybdate d'ammonium et la gélatine. Nous n'avons malheureusement pu nous procurer son travail original.

8° Nous avons encore pu prouver *l'existence de cette combinaison protéines-molybdate* par des *mesures polarographiques*.

On sait que la formation d'un complexe déplace le potentiel de demi-onde du métal considéré (E 1/2) vers des valeurs négatives plus élevées [66, 90]. Nous avons donc étudié le déplacement du potentiel du molybdène dans divers mélanges albumines-molybdate en fonction de la concentration du milieu en ces deux constituants.

Nous avons préparé une série de mélanges contenant des quantités variables d'une solution d'albumines de Cheval à 2 p. 100 et de molybdate d'ammonium à 4 p. 100. Ces solutions, complétées à 5 ml, ont été ajoutées à 5 ml de solution de citrate d'ammonium M à *p*H 7, utilisé comme électrolyte de base. Le tableau V indique les valeurs de E 1/2 pour des concentrations variées en molybdate et en protéines.

TABLEAU V

Concentration du mélange en molybdate d'ammonium (p. 1.000)	Concentration du mélange en albumines (p. 1.000)									
	0	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
4	— 0,91	— 0,91	— 0,91	— 0,91	— 0,92	— 0,92	— 0,96	— 1,05	— 1,14	— 1,18
8	— 0,94	— 0,94	— 0,94	— 0,94	— 0,94	— 0,94	— 0,96	— 1,03	— 1,14	— 1,20
12	— 0,94	— 0,94	— 0,94	— 0,94	— 0,94	— 0,95	— 0,98	— 1,06	— 1,16	— 1,21

On constate que plus la concentration en molybdate est élevée, plus le potentiel du complexe se déplace vers des valeurs négatives.

Lorsque l'on ajoute dans le vase polarographique contenant la solution de citrate, un mélange albumines-molybdate, on ne peut jamais mettre simultanément en évidence deux vagues polarographiques, celle correspondant au molybdène seul (E 1/2 = — 0,94) et celle correspondant au complexe (E 1/2 $\doteq$ — 1,20 environ pour un rapport albumines/molybdate égal à l'unité); on n'observe qu'un déplacement vers des valeurs plus négatives qui peuvent atteindre — 1,21 dans notre expérience; tout se passe donc comme si la protéine

était capable de fixer tout le molybdate d'ammonium présent dans la solution.

Lorsque l'on examine les valeurs de E 1/2 en fonction de la concentration en albumines, on note que plus cette dernière est élevée, plus le potentiel se trouve déplacé vers les valeurs négatives. Inversement, plus la dilution est grande, plus la valeur de E 1/2 du complexe se rapproche de celle du molybdène pur. A partir d'une certaine dilution, on ne peut donc mettre en évidence un déplacement du E 1/2, c'est-à-dire la formation de complexe en quantité notable. Signalons que ce phénomène se produit quelle que soit la concentration du milieu en molybdate d'ammonium.

9° Nous avons précédemment cherché à expliquer l'influence exercée par la dilution du milieu sur la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium. Nous avons montré, en effet, que plus le milieu est dilué, plus le pourcentage de protéines insolubilisées par le molybdate est élevé. Pour expliquer cette constatation, nous avons supposé, entre autres choses, qu'il se forme des complexes globulines-albumines et *que les albumines exercent un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la précipitation des globulines par le molybdate d'ammonium.* Le but des expériences suivantes est de voir si cette hypothèse est bien fondée.

Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé une solution d'euglobulines à 1 p. 100 que nous avons répartie en dix échantillons; à chacun de ces échantillons, nous avons ajouté des quantités variables de solution de sérum-albumine à 1 p. 100 également. Partout nous avons complété à un même volume avec de l'eau physiologique. Nous avons ajouté alors à chaque échantillon un même volume de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100. Après mélange, nous avons dosé les protéines dans les précipités formés.

L'examen des résultats nous montre qu'effectivement la quantité de protéines précipitées diminue lorsque la quantité de sérum-albumine ajoutée augmente. Pouvons-nous en conclure, ainsi que le fait Jolin [58] à l'issue d'une expérience analogue, que la sérum-albumine exerce un effet inhibiteur sur la précipitation des euglobulines du sérum ? Nous ne le pensons pas. En effet, dans nos expériences, la quantité totale de protéines croît d'un échantillon au suivant, de telle sorte que si nous sommes à la concentration optimum en molybdate d'ammonium pour insolubiliser les protéines dans le

premier mélange, nous nous éloignons de plus en plus de cet optimum dans les mélanges suivants. On constate d'ailleurs que le *p*H des différents mélanges croît régulièrement au fur et à mesure que la quantité d'albumine ajoutée augmente et cette variation de *p*H peut fort bien expliquer la diminution de la précipitation des euglobulines.

Dans une deuxième série d'expériences, nous appuyant sur le fait que les globulines sériques sont insolubilisées par le molybdate d'ammonium tandis que les albumines ne le sont pas, nous avons cherché à nous rendre compte si la précipitation des protéines sériques par le molybdate dépend du rapport albumines/globulines.

Pour cela, nous avons préparé des globulines et des albumines de Cheval et nous avons réalisé diverses gammes de mélanges contenant des proportions variables de ces fractions, mais avec une concentration en protéines totales constante dans chacune des séries constituées. Nous avons alors ajouté à chaque échantillon une quantité appropriée de solution de molybdate d'ammonium (optimum pour la concentration du milieu en protéines) et nous avons évalué dans tous les cas la quantité de protéines insolubilisées.

Nous avons particulièrement étudié des concentrations en protéines totales de 8 mg et 4 mg par millilitre (ce qui correspond à des sérums dilués au dixième et au vingtième) et des rapports albumines/globulines de 1,5, 1,0 et 0,5.

Les résultats que nous avons obtenus prouvent clairement que la quantité de protéines précipitées augmente régulièrement lorsque le rapport albumines/globulines diminue. C'est ce qu'avait déjà observé Jolin [58], bien qu'il utilisât des concentrations en protéines trop élevées pour que le phénomène apparaisse nettement. Ceci s'explique aisément puisque, lorsque ce rapport diminue, nous avons une diminution des albumines non précipitables par le molybdate d'ammonium et une augmentation des globulines qui, elles, sont fortement insolubilisées par ce sel. Ces résultats devaient se révéler, comme l'avait prévu Jolin, des plus intéressants pour l'étude des dysprotéinémies, mais ils ne nous permettent de dire en aucune façon que la diminution de l'insolubilisation des protéines lorsque le rapport albumines/globulines augmente est une preuve d'un effet inhibiteur.

Pour essayer de vérifier ce point, il était nécessaire de disposer d'une série de mélanges contenant une quantité fixe de globulines et des quantités variables d'albumines, comme

dans notre première série d'expériences; mais il fallait être sûr qu'après addition d'un volume approprié de solution de molybdate d'ammonium aux différents échantillons, le *p*H dans tous les mélanges se trouvait être identique.

Nous sommes parvenu à ce résultat en ajoutant à chaque échantillon un volume convenable de tampon de Britton et Robinson à base d'acide phosphorique, acide acétique, acide borique et hydroxyde de sodium; la présence de ce tampon, ainsi que nous avons pu nous en rendre compte, ne provoque aucune modification dans l'insolubilisation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium.

Nos résultats nous ont prouvé que si l'on maintient un *p*H de 5,1 identique dans tous les échantillons, il est possible de faire varier la quantité d'albumines ajoutée à une quantité donnée de globulines sans modifier de façon significative l'insolubilisation de ces dernières par le molybdate d'ammonium : il y a toujours 60 à 70 p. 100 des globulines mises en œuvre qui s'insolubilisent. Voici, par exemple, les résultats obtenus au cours d'une de nos expériences.

Nous avons tout d'abord préparé des solutions de globulines et d'albumines de Cheval à 8 mg par millilitre; puis nous avons réalisé les mélanges suivants (tableau VI) :

TABLEAU VI

Tubes	1	2	3	4	5	6	7
Globulines (ml)	2	2	2	2	2	2	2
Albumines (ml)	0	1	2	3	4	5	6
Tampon (ml)	4	4	4	4	4	4	4
Molybdate d'ammonium à 5 p. 100 (ml)	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
Eau physiologique (ml)	6,6	5,5	4,4	3,3	2,2	1,1	0

Les protéines insolubilisées ont été récupérées par centrifugation et dosées. Le tableau VII résume les résultats obtenus.

Nous pouvons donc conclure que, si les proportions respectives des diverses fractions protéidiques du sérum exercent une influence évidente sur le pouvoir précipitant du molybdate d'ammonium, il ne paraît pas possible de parler d'inhibition de la précipitation des globulines par les albumines.

TABLEAU VII

Tubes	1	2	3	4	5	6	7
Protéines insolubilisées (mg)	8,3	8,4	8,7	9,4	9,0	9,4	9,2

10° Un dernier point de notre étude de l'action du molybdate d'ammonium sur les protéines sériques nous a conduit à *envisager le rôle éventuellement joué par les lipides dans l'insolubilisation des protéines sériques par ce sel.*

On sait que le sérum sanguin, malgré sa limpidité et son homogénéité, contient une très appréciable quantité de lipides (5 à 10 g par litre). Ces lipides se trouvent fixés aux protéines et forment les cénapses lipido-protéidiques (Machebœuf [78]). Ils apportent des modifications parfois notables à la solubilité des protéines auxquelles ils sont fixés. Dans le domaine de la pathologie hépatique, cette constatation prend une grande importance : qu'il nous suffise de rappeler le thymol-test de Maclagan qui dépend dans une grande mesure de la quantité de lipoprotéines, donc de lipides présents dans le sérum (voir p. 35). Aussi existe-t-il des possibilités de réaction au thymol « faussement positive » dans certains sérums hyperlipidémiques [127]. De même, chez les cirrhotiques en période prémortelle, le thymol-test, après avoir été longtemps positif, redevient négatif. Cela est dû au fait que les lipides ayant en grande partie disparu du sang (cholestérol total inférieur à 1 g par litre), les protéines ont acquis des propriétés de solubilité nouvelles et le test reprend une valeur normale malgré une aggravation de la maladie [59]. On se retrouve ainsi, par suite d'une véritable délipidation du sérum *in vivo*, dans les conditions expérimentales décrites par Recant, Chargaff et Hanger [113] qui ont démontré que la délipidation du sérum négative la réaction.

Il était donc intéressant de savoir si la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium allait être influencée par les lipides du sérum sanguin. Jolin [58] avait déjà comparé la précipitation des protéines du sérum de Cheval par le molybdate et celle des protéines du même sérum préalablement délipidé au moyen de la technique de Saïas [120] qui utilise l'acétone et l'éther à basse température,

Il conclut que l'influence exercée par les lipides des cénapses sur la précipitation des protéines sériques par le molybdate est très minime, pour ne pas dire nulle.

Nous avons désiré vérifier ce point et, pour cela, nous avons préparé un certain nombre d'échantillons de sérum de Cheval dilué au dixième ou au vingtième et du sérum aux mêmes dilutions, délipidé au préalable au moyen de la technique de Hardy et Gardiner [42]. A chaque échantillon nous avons ajouté un volume différent de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 et partout nous avons complété à un même volume avec de l'eau physiologique. Nous avons enfin dosé les protéines dans les précipités formés. Le tableau VIII résume le protocole expérimental et les résultats obtenus au cours d'un de nos essais.

Nos résultats montrent que la délipidation ne diminue nullement la précipitation des protéines sériques par le molybdate; au contraire, les échantillons délipidés sont davantage insolubilisés par le sel que les échantillons correspondants non délipidés.

TABLEAU VIII

Tubes	1	2	3	4	5	6
Sérum non délipidé dilué au 1/10 (ml)	2	2	2	....	....	....
Sérum délipidé dilué au 1/10 (ml)	....	....	....	2	2	2
Molybdate d'ammonium (ml)	0,1	0,2	0,4	0,1	0,2	0,4
Eau physiologique (ml)	1,9	1,8	1,6	1,9	1,8	1,6
Protéines insolubilisées (μg)	3.600	5.040	4.240	6.400	7.520	6.960

Les lipides du sérum sanguin inhibent-ils donc la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium ? L'étude simultanée des courbes de *p*H pour les séries d'échantillons délipidés et pour les séries d'échantillons non délipidés devait nous révéler que l'on parvient à un *p*H légèrement plus faible dans le premier cas que dans le second; il était difficile de comprendre comment les lipides sériques sont susceptibles d'intervenir sur le *p*H de mélanges de sérum et de molybdate d'ammonium. De plus, dans certains de nos essais, nous constations que l'optimum de précipitation et

le *p*H le plus bas étaient atteints pour une quantité de molybdate légèrement plus faible dans la série délipidée que dans la série non délipidée, comme si l'effet tampon exercé par le sérum dilué vis-à-vis du molybdate était moindre après délipidation.

Nous eûmes l'idée que ces différences étaient peut-être dues au fait qu'un certain nombre de petites molécules, jouissant éventuellement d'un pouvoir tampon non négligeable, phosphates, par exemple), étaient enlevées par la délipidation; ce départ permettrait aux mélanges sérum-molybdate d'ammonium d'atteindre des *p*H plus bas et par conséquent de présenter une insolubilité plus marquée après délipidation.

Pour vérifier le bien-fondé de cette hypothèse, nous avons comparé l'action du molybdate d'ammonium sur un sérum de Cheval délipidé et sur le même sérum simplement dialysé pendant douze heures contre de l'eau courante, puis quarante-huit heures contre de l'eau physiologique fréquemment renouvelée. Dans ces conditions, les deux séries d'échantillons nous ont fourni des résultats presque superposables, aussi bien en ce qui concerne les quantités de protéines insolubilisées par le molybdate qu'en ce qui concerne les valeurs des *p*H des mélanges réalisés.

Nous pouvons donc conclure que les lipides des cénapses lipido-protéidiques n'exercent qu'une influence très minime sur la précipitation des protéines sériques par le molybdate d'ammonium.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE PREMIER

Nous avons envisagé dans ce chapitre l'aspect physico-chimique de l'action du molybdate d'ammonium sur les protéines sériques.

L'addition d'une solution de molybdate à du sérum sanguin ou à des solutions de globulines provoque l'insolubilisation d'une partie des protéines. La concentration du milieu en sel, la nature des protéines et leur concentration, ainsi que le rapport existant entre les concentrations en molybdate et en protéines interviennent sur le phénomène. En se plaçant dans certaines conditions, il est possible d'insolubiliser sélectivement les β et γ-globulines sériques. L'influence du *p*H du milieu est prépondérante dans toutes ces observations. Nous avons montré qu'il se forme une combinaison de type électro-

valentiel entre les protéines et le molybdate. Grâce à des mesures d'électrotitration, nous avons pu préciser les conditions de formation de cette combinaison. Ces associations molybdate-protéines s'insolubilisent à partir d'un *p*H suffisamment bas, qui dépend de l'ionisation de la protéine sérique entrant dans leur constitution. Bien que les proportions respectives des diverses fractions protéidiques du sérum influencent le pouvoir précipitant du molybdate d'ammonium, les albumines n'exercent aucune action inhibitrice sur l'insolubilisation des globulines par ce sel; celle-ci se montre, d'autre part, indifférente à la concentration en lipides éventuellement fixés sur les protéines de la solution.

CHAPITRE II

RÉALISATION D'UN TEST DE DYSPROTÉINÉMIE AU MOYEN DU MOLYBDATE D'AMMONIUM

Au cours du précédent chapitre, nous avons montré que l'addition d'une solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 à du sérum sanguin, peut provoquer, dans certaines conditions, l'insolubilisation spécifique des β et γ-globulines. Celle-ci pouvant être presque quantitative, il y avait là un moyen d'étudier diverses dysprotéinémies. Jolin [58] avait envisagé cet aspect de l'action du molybdate sur les protéines sériques et avait observé une concordance satisfaisante entre l'intensité de la précipitation (évaluée par mesure opacimétrique) et le rapport albumines/globulines.

A la lumière des résultats que nous avons précédemment rapportés, il nous a semblé qu'il pouvait être plus fructueux d'utiliser le molybdate d'ammonium pour en faire un test du

$$\text{rapport} = \frac{\text{albumines} + \alpha\text{-globulines}}{\beta\text{-globulines} + \gamma\text{-globulines}}.$$

Le premier point à résoudre était de trouver une concentration en protéines qui permette une insolubilisation aussi sélective que possible des globulines β et γ. En opérant sur le sérum non dilué, comme Jolin, on ne peut obtenir de précipité que pour une concentration en molybdate relativement importante, donc un *p*H élevé de l'ordre de 5,2; ce précipité est très faible, de sorte qu'une partie importante des globulines β et γ est restée en solution, ce que confirme l'étude électrophorétique de la solution surnageante.

En suivant au moyen de l'électrophorèse la nature et la quantité de protéines insolubilisées par le molybdate pour diverses concentrations en protéines, nous avons pu constater que l'addition de molybdate d'ammonium à du sérum dilué au dixième provoque l'insolubilisation spécifique des globulines β et γ (voir p. 54). Après addition de solution de molybdate à 5 p. 100 en quantité égale au dixième de celle de la solution protéidique mise en œuvre, cette insolubilisation est pratiquement complète. La concentration en molybdate est alors de 0,5 p. 100 et conduit à des *p*H de l'ordre de 5,0.

Lorsque l'on étudie des dilutions de sérum plus importantes, la précipitation commence à se produire pour de très faibles concentrations en molybdate, ce qui conduit à des *p*H inférieurs à 5,0. Aussi le précipité qui apparaît voit-il augmenter son importance relative et les globulines β et γ insolubilisées sont souillées d'albumines et de globulines α.

En définitive, nous préconisons pour étudier les dysprotéinémies au moyen du test au molybdate de travailler avec du sérum dilué au dixième et une concentration en molybdate d'ammonium de 0,5 p. 100. Une très petite quantité de sérum suffit donc à l'examen.

Comment apprécier l'importance du précipité formé ? La mesure opacimétrique n'est pas applicable ici, car sa précision est réduite et, avec du sérum dilué au dixième, la quantité de protéines insolubilisées est beaucoup trop importante. Il est donc préférable d'en effectuer le dosage. Il existe à l'heure actuelle diverses méthodes permettant de doser rapidement et avec une bonne précision de faibles quantités de protéines. Nous avons pour notre part utilisé la méthode de Macheboeuf, Lacaille et Rebeyrotte [84], qui permet de doser commodément des quantités de protéines comprises entre 200 et 2.000 μg dans la prise d'essais.

L'importance du précipité possède déjà en elle-même une signification intéressante et son dosage donne tous les renseignements qu'on peut tirer d'un test rapide de dysprotéinémie, avec en plus l'avantage d'une détermination quantitative rigoureuse. Mais le dosage des protéines par une méthode colorimétrique comme la méthode de Macheboeuf est si simple et rapide que nous pensons préférable de doser également les protéines restant dans le surnageant. De cette

façon, il devient possible de déterminer exactement le rapport $\frac{\text{albumines} + \alpha\text{-globulines}}{\beta\text{-globulines} + \gamma\text{-globulines}}$. De plus, sans aucune opération supplémentaire, la totalisation des protéines retrouvées dans le surnageant et dans le précipité conduit à la connaissance parfaite de la protéinémie du sérum examiné.

Notre mode opératoire sera donc le suivant :

0,2 ml de sérum sont additionnés de 1,8 ml d'eau physiologique constituant ainsi une dilution au dixième; on ajoute 0,2 ml de solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 et complète à 4 ml avec de l'eau physiologique. Ce mélange, réalisé dans un tube à centrifuger conique de volume approprié, est laissé en repos dix minutes, puis centrifugé; la sédimentation est rapide et toujours complète en moins de cinq minutes.

Après centrifugation, le surnageant est décanté et le précipité formé est redissous avec 1 goutte d'ammoniaque et 4 ml d'eau physiologique; la redissolution est immédiate.

On prélève 0,5 ml de surnageant et 1 ml de solution de précipité (1.000 à 1.500 μg de protéines) et complète éventuellement chaque prise à 1 ml avec de l'eau physiologique; on ajoute 2 ml de solution d'acide nitrique (à 225 ml d'acide à 40° B par litre) et on place les deux mélanges vingt-cinq minutes dans un bain-marie bouillant; on laisse refroidir pendant dix minutes et l'on ajoute 1,5 ml d'ammoniaque à 22° B. Après un quart d'heure, on peut effectuer la lecture de l'intensité des colorations à l'électrophotomètre en utilisant une longueur d'onde de 430 mμ.

L'ensemble de ces opérations dure environ une heure trente et se prête parfaitement aux déterminations en grande série. On voit donc l'avantage sur des techniques comme l'électrophorèse qui, même après l'amélioration réalisée par le développement de la microélectrophorèse sur papier, ne donne un résultat qu'au bout de vingt-quatre heures, chaque appareil ne permettant de plus qu'un nombre d'examens relativement restreint à la fois.

Quels sont les résultats que nous avons obtenus ? En opérant comme nous venons de le décrire sur un sérum humain normal, un grand nombre d'essais nous ont montré que 30 à 40 p. 100 des protéines du sérum se trouvent insolubilisées,

ce qui conduit à un rapport surnageant/précipité (S/P) compris entre 1,5 et 2. Nous considérons que la normalité cesse lorsque le taux de protéines précipitées atteint 45 p. 100 (S/P voisin de 1,2). 50 p. 100 de protéines insolubilisées représentent une dysprotéinémie nette (S/P = 1). La dysprotéinémie devient considérable quand le molybdate précipite plus de 55 p. 100 des protéines du sérum (S/P = 0,8).

Les avantages de cette technique nous semblent être les suivants :

— Technique simple, rapide, peu onéreuse et se prêtant aux investigations en série;

— Résultats quantitatifs, d'interprétation plus facile que celle des tests rapides préconisés pour l'étude clinique des dysprotéinémies;

— Obtention simultanée de la protéinémie totale;

— Spécificité biochimique supérieure à celle du rapport albumines/globulines ou des tests d'étude de la labilité colloïdale du sérum puisqu'il n'y a ici que deux facteurs en jeu : la teneur du sérum en β et en γ-globulines;

— Spécificité clinique supérieure à celle des tests qui n'étudient que la γ-globulinémie, comme le test de Hanger ou celui de Kunkel au sulfate de zinc.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Nous avons exposé dans ce chapitre les conditions opératoires les meilleures pour l'étude du rapport

$$\frac{\text{albumines} + \alpha\text{-globulines}}{\beta\text{-globulines} + \gamma\text{-globulines}}$$

par addition de molybdate d'ammonium au sérum sanguin.

Nous indiquons en détail la technique utilisée dans ce but, ainsi que les résultats obtenus et nous essayons de montrer ses avantages sur les autres procédés d'étude des dysprotéinémies.

CHAPITRE III

ÉTUDE CLINIQUE DES DYSPROTÉINÉMIES AU MOYEN DU TEST AU MOLYBDATE

Après avoir indiqué les caractères principaux de l'action du molybdate d'ammonium sur les protéines sériques et mis au point une adaptation des résultats obtenus à l'étude de l'équilibre protéique du sérum, il nous est possible de passer en revue diverses applications cliniques de ce test. Pour cela, nous avons recherché les affections caractérisées par des modifications du spectre des protéines sériques et examiné les répercussions de ces dysprotéinémies sur les valeurs obtenues dans l'épreuve au molybdate. Nous avons confronté les résultats observés avec ceux fournis par trois tests classiques de dysprotéinémie, mais relevant, ainsi que nous l'avons précédemment exposé, de mécanismes fort différents : le test de Gros au bichlorure de mercure, le test de Maclagan au thymol et le test de Kunkel au sulfate de zinc. Nous avons, d'autre part, contrôlé la nature et l'importance de chaque dysprotéinémie au moyen de l'électrophorèse sur papier.

Nous envisagerons, pour la commodité de l'exposé, deux groupes de dysprotéinémies : celles dues à une cause hépatique et celles relevant d'une cause extrahépatique.

I. — LE TEST AU MOLYBDATE DANS LES DYSPROTÉINÉMIES D'ORIGINE HÉPATIQUE

Les résultats que nous avons obtenus dans les affections de ce type sont rapportés dans le tableau IX.

Outre les valeurs de notre test (S/P), le tableau donne les chiffres de la protéinémie totale (P) et ceux des trois tests conjointement étudiés.

TABLEAU IX

N°	Sérum	Nature de l'affection	Test au molybdate (S/P)	P (g p. l)	Maclagan (unités Meunier)	Kunkel (unités Meunier)	Gros (ml)
1	1360	Cirrhose éthylique	1,0	76	40	97	1,2
2	1398	Cirrhose éthylique atrophique.....	0,7	74	81	310	0,7
3	1403	— — —	1,3	68	77	85	0,9
4	1458	Cirrhose éthylique	1,1	68	50	90	1,3
5	1455	— —	0,8	82	60	.....	0,9
6	1452	— —	0,8	81	30	.....	1,0
7	1467	— —	0,5	63	175	.....	0,5
8	GRI	— —	0,3	66	120	327	0,4
9	DAR	Cirrhose éthylique avec ascite	0,6	63	76	303	0,5
10	POI	Cirrhose éthylique avec début d'ascite.	0,9	87	72	.....	1,3
11	DAR	Cirrhose éthylique	2,0	68	22	92	0,9
12	1544	— —	1,1	64	101	213	0,9

15	POI	Cirrhose éthylique avec début d'ascite.	0,6	93	92	172	0,7
16	1932	Cirrhose éthylique	0,9	66	82	162	0,8
17	DUF	—	0,4	82	163	335	0,8
18	BIL	.....	0,6	61	81	225	1,0
19	6-35	Précirrhose éthylique	0,9	86	49	190	1,9
20	25-12	— —	2,4	54	65	120	1,8
21	MAL	Cirrhose bronzée avec ascite	0,6	64	82	260	0,6
22	MAL	Cirrhose bronzée	0,8	58	93	169	1,1
23	25-1	Hépatite amibienne	1,1	87	178	271	0,8
24	1809	Hépatite à virus	1,0	76	173	134	1,2
25	LAB	Cirrhose post-virale	0,55	72	75	260	0,8
26	1812	Ictère par rétention (calcul du cholédoque)	1,4	61	14	33	1,8
27	TRU	Ictère par rétention (néo de la tête du pancréas)	1,3	67	27	85	1,9
28	TRU	Ictère par rétention (néo de la tête du pancréas)	0,8	59	84	139	0,7

L'examen des résultats figurant dans ce tableau permet de faire les constatations suivantes :

1° En considérant les chiffres dans leur ensemble, on observe qu'il existe un parallélisme des plus satisfaisants entre les résultats fournis par le test au molybdate et ceux donnés par les tests classiques étudiés simultanément.

2° Si la concordance est la règle lorsqu'on l'exprime seulement en résultats positifs ou négatifs, il y a souvent, bien entendu, des décalages quantitatifs dans l'intensité des réponses. Cela tient au fait que, quel que soit son mécanisme pathogénique, toute lésion hépatique comporte l'association à des degrés divers de deux éléments : une atteinte cellulaire plus ou moins importante, un développement et un remaniement plus ou moins extensif du tissu conjonctif hépatique. C'est, en somme, un bilan de ces deux types de lésions et de leurs modalités évolutives que fournit l'exploration fonctionnelle du foie. D'autre part, ainsi que nous l'avons dit, le mécanisme des diverses réactions utilisées est fort différent, de telle sorte que chacune d'elles, employée séparément, renseigne davantage sur l'un ou l'autre type lésionnel : la réaction de Gros, dans la mesure où elle dépend de l'hypoalbuminémie, teste plutôt l'insuffisance cellulaire, tandis que les réactions de Maclagan ou de Kunkel renseignent sur l'hyperglobulinémie et, par conséquent, sur la réponse du système mésenchymateux hépatique à l'agression.

Par son mécanisme, le test au molybdate se rapproche surtout de ces deux derniers et cette parenté se retrouve parfaitement sur le plan clinique. Moins sensible que la réaction de Gros que tout changement du spectre protéinique modifie (ce qui a souvent l'inconvénient de provoquer une réaction positive dans un état à peine pathologique), plus nuancée que la réaction de Kunkel car une hyper-γ-globulinémie isolée, à moins qu'elle soit particulièrement intense, n'entraîne pas un effondrement du rapport S/P, la réaction au molybdate se montre tout à fait voisine de celle de Maclagan. Elle présente sur cette dernière l'avantage de ne pas être influencée par le niveau de la lipémie : l'observation n° 1 nous indique pour le thymol-test une valeur relativement faible de 40, alors que le test de Gros et celui au molybdate sont déjà sérieusement perturbés; ce fait s'explique lorsque l'on considère que le cholestérol total du malade atteint à peine 0,60 g par litre. Inversement, la précirrhose éthylique de l'observation n° 20 nous semble tout à fait normale avec

le test au molybdate, tandis que le test au thymol est nettement positif; mais il y a 3,80 g de cholestérol par litre et le lipidogramme révèle une quantité de β-lipoprotéines nettement plus élevée que normalement.

3° La réaction au molybdate est particulièrement intense dans les cas de cirrhose; elle semble plus discrète, encore que très nette, dans les cas d'hépatite à virus ou parasitaire. C'est dans ce type d'affections que le test au thymol conduit, au contraire, aux chiffres les plus importants; cela montre bien que le mécanisme des deux réactions est certainement voisin, mais non identique.

4° Comme la réaction de Maclagan, le test au molybdate reste absolument négatif dans tous les cas d'ictère par rétention, quelle qu'en soit l'étiologie. Encore faut-il, bien entendu, que l'examen ait été pratiqué avant que l'obstruction n'ait provoqué des lésions cellulaires, ces dernières entraînant à leur suite les signes habituels du déficit fonctionnel. Un bon exemple de ce fait se trouve rapporté dans les examens n°s 27 et 28 : au début d'un ictère par rétention provoqué par un néoplasme de la tête du pancréas, tous les tests, y compris celui au molybdate, sont négatifs; mais après un mois d'évolution, tous sont fortement positifs.

5° Cette valeur pronostique de la réaction au molybdate se retrouve également dans le cas des cirrhoses : la comparaison des observations n°s 9 et 11 indique clairement combien cette cirrhose a été améliorée par le traitement; seul le test de Gros, dans le deuxième examen, est encore anormal. Les observations sont certes moins satisfaisantes lorsque l'on compare les résultats n° 8 et n° 14 où la grave cirrhose étudiée n'a été que peu améliorée, une ascite étant même apparue entre les deux examens. Et notre test reflète bien l'aggravation de la maladie dans le cas POI (examens n°s 10 et 15) dont l'ascite débutante au premier examen s'était accentuée lors du deuxième et dont l'état général avait beaucoup décliné.

Dans tous ces cas, le parallélisme entre l'évolution clinique et le test au molybdate mérite d'être relevé.

II. — LE TEST AU MOLYBDATE DANS LES DYSPROTÉINÉMIES D'ORIGINE EXTRAHÉPATIQUE

Si les dysprotéinémies sont très souvent, en clinique, dues à des perturbations hépatiques, au point que « test de

TABLEAU X

N°	Sérum	Nature de l'affection	Test au molybdate (S/P)	P (g p. l)	Maclagan (unités Meunier)	Kunkel (unités Meunier)	Gros (ml)
1	1402	Tuberculose pulmonaire (avec éthylisme)	0,7	57	72	.....	.....
2	1469	Néo du poumon	1,5	64	26	.....	.....
3	1349	— du côlon	1,3	73	10	.....	1,6
4	1387	— du col utérin	2,2	59	14	.....	1,5
5	1882	— -	0,9	93	121	344	1,5
6	1500	Néphrite	1,7	58	35	57	1,7
7	REG	Néphrose lipoïdique	2,2	58	56	28	> 2
8	FRE	— —	0,9	57	43	15	> 2
9	1507	Rhumatisme articulaire aigu	2,4	63	20	86	1,7
10	BEI	— — —	1,7	74	40	194	1,3
11	1937	— — —	2,0	75	24	147	1,6
12	LAV	Endocardite post-rhumatismale	1,8	74	11	58	1,6

16	1881	—	1,35	87	89	331	1,4
17	1810	Maladie de Parkinson	3,2	64	27	54	2,0
18	1878	Aortite	1,8	65	45	95	2,0
19	1929	Artérite	2,5	63	9	68	> 2
20	BRE	Coronarite	1,5	66	41	10	> 2
21	BRO		2,4	79	60	20	> 2
22	LAB		2,5	66	30	18	> 2
23	BAL		2,1	73	6	84	> 2
24	DUT	Infarctus du myocarde	2,3	74	5	50	> 2
25	VIL	— —	1,6	66	62	38	> 2
26	CAR	—	2,1	62	5	20	> 2
27	BOU	Fibrinolyse	1,2	42	45	36	1,4
28	1505	Plasmocytome α	2,2	66	24	88	1,2
29	PER	— γ	0,27	126	49	120	0,8
30	BER	— γ	0,8	85	100	275	0,6
31	17-158	— β	0,7	92	85	142	1,0

dysprotéinémie » est devenu synonyme, à tort assurément, de « test de dysfonctionnement hépatique », il est bien évident que de nombreuses dysprotéinémies ne sont pas d'origine hépatique.

C'est aussi à l'étude de ces dernières que nous avons voulu appliquer notre test au molybdate. Nos résultats sont résumés dans le tableau X où nous avons groupé les mêmes renseignements que dans le précédent tableau.

L'examen de ces résultats appelle de notre part les remarques suivantes :

1° Le parallélisme observé entre les résultats donnés par le test au molybdate et ceux fournis par les trois autres tests étudiés conjointement se retrouve ici.

2° Tout état infectieux, lorsqu'il vient se greffer sur une affection, provoque une chute du rapport S/P, sans doute consécutive à une hyper-γ-globulinémie : il en est ainsi, par exemple, de néoplasmes infectés (observation n° 5) ou de maladies d'Osler (observations n°s 13, 14, 15 et 16). Ce fait peut avoir un intérêt diagnostique et pronostique important lorsqu'il s'agit de détecter une greffe bactérienne sur un rhumatisme articulaire aigu.

3° Les néphroses lipoïdiques se montrent négatives vis-à-vis du test tant que la perturbation des protéines reste limitée aux albumines et aux globulines α (observation n° 7) ; elles deviennent positives lorsque la dysprotéinémie s'étend aux β-globulines (observation n° 8).

4° Les affections vasculaires, en l'absence de processus infectieux, conduisent toujours à des résultats négatifs avec la réaction au molybdate d'ammonium; les lipémies élevées que l'on rencontre dans ce type d'affections sont à l'origine de tests au thymol nettement positifs (observations n°s 21 et 25).

5° Les plasmocytomes donnent avec le molybdate des résultats différents selon leur nature : les plasmocytomes α semblent conduire à des rapports S/P normaux, tandis que ceux du type γ donnent des rapports très abaissés, parfois même complètement effondrés; les variations des autres tests de dysprotéinémie se font dans le même sens.

Pour résumer les enseignements qu'il est possible de retirer de nos résultats, nous dirons que le test de dysprotéinémie au molybdate d'ammonium nous semble suivre l'évolution clinique tout aussi bien que les tests classiques utilisés dans

ce but. Sa sensibilité et sa spécificité, que nous avions prévues par l'étude physico-chimique de l'action du molybdate d'ammonium sur les protéines sériques, se sont trouvées confirmées sur le plan clinique. Ce test présente, d'autre part, certains avantages dus au fait qu'il est fort peu sensible aux variations du taux d'albumines ou de lipides fixés aux protéines; ceci ressort nettement de comparaisons réalisées avec le thymol-test de Maclagan. A la différence des tests classiques préconisés pour l'étude clinique des dysprotéinémies, la réaction au molybdate fournit, avec nos conditions opératoires, des résultats parfaitement quantitatifs, superposables à ceux de l'électrophorèse et par conséquent faciles à interpréter. Enfin, sans aucune manipulation supplémentaire, on obtient la valeur de la protéinémie totale.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Dans cette dernière partie de notre travail, nous avons passé en revue diverses applications du test au molybdate d'ammonium à l'étude de dysprotéinémies d'origine hépatique ou extrahépatique.

Nous avons confronté les résultats obtenus avec ceux fournis par trois tests classiques : ceux de Gros, Maclagan et Kunkel au sulfate de zinc.

Les résultats se sont montrés en parfait accord avec la clinique et se sont particulièrement rapprochés de ceux fournis par le test au thymol de Maclagan; mais notre test présente sur ce dernier l'avantage de ne pas être influencé par la quantité de lipides fixés aux protéines.

L'utilisation du test au molybdate nous paraît donc se justifier dans l'étude clinique des dysprotéinémies.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Après avoir présenté les principales méthodes qui permettent de fractionner et de séparer les diverses protéines du sérum sanguin, nous avons montré les avantages et les inconvénients de chacune d'entre elles ainsi que les difficultés que l'on éprouve à réaliser un inventaire précis et exact des protéines sériques.

Nous avons ensuite rappelé les critères de la protéinémie normale et indiqué sommairement les variations pathologiques essentielles de cette dernière, ainsi que celles pouvant intervenir séparément sur chaque fraction protéique. Nous avons rappelé les différents moyens dont on dispose à l'heure actuelle pour mettre en évidence les dysprotéinémies, en insistant tout particulièrement sur différents tests rapides très souvent utilisés dans ce but; le mécanisme d'action plus ou moins complexe de ces tests est exposé et discuté.

Dans le premier chapitre de nos recherches expérimentales, nous avons rappelé tout d'abord certains résultats que nous avions précédemment obtenus dans l'étude de l'action du molybdate d'ammonium sur les protéines sériques; l'addition de molybdate à une dilution convenable de sérum insolubilise les β et γ-globulines; les albumines n'exercent aucun effet protecteur réel sur ce phénomène qui, de plus, est absolument indépendant des lipides éventuellement fixés sur les protéines.

L'action du molybdate d'ammonium sur les protéines sériques s'explique par l'existence d'une combinaison entre les protéines et le sel. Nous avons pu prouver, grâce à des mesures d'électrotitration, qu'il s'agit d'une combinaison de type électrovalentiel. Ces combinaisons protéines-molybdate s'insolubilisent pour des *p*H qui sont d'autant plus bas, lorsque l'on considère les différentes fractions protéidiques, que le point isoélectrique de la fraction présente une valeur plus

faible. La diminution de *p*H engendrée par l'addition de molybdate d'ammonium à une solution de protéines sériques suffit à entraîner la précipitation des complexes β-globulines-molybdate et γ-globulines-molybdate, les complexes albumines-molybdate restant en solution.

Dans le chapitre suivant, nous avons envisagé une adaptation de ces résultats à l'étude de l'équilibre protéique du sérum : nous proposons pour cela un test qui consiste à ajouter à du sérum, préalablement dilué au dixième, le dixième de son volume d'une solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100, puis à doser les protéines insolubilisées et celles qui restent en solution. Les résultats ainsi obtenus sont tout à fait parallèles au rapport :

$$\frac{\text{albumines} + \alpha\text{-globulines}}{\beta\text{-globulines} + \gamma\text{-globulines}}$$

Dans le dernier chapitre de notre travail, nous avons passé en revue diverses applications de ce test à l'étude de dysprotéinémies. Nous avons confronté les résultats obtenus avec ceux fournis par trois tests classiques : celui de Gros, celui de Maclagan et celui de Kunkel au sulfate de zinc. Nos résultats se sont particulièrement rapprochés de ceux donnés par le test au thymol de Maclagan, mais notre test présente sur ce dernier l'avantage de ne pas être influencé par la quantité de lipides fixés aux protéines. D'autre part, cette technique, qui se prête parfaitement aux analyses en série, permet de connaître la valeur de la protéinémie totale et conduit à des résultats beaucoup plus quantitatifs et faciles à interpréter que les tests rapides habituellement préconisés pour l'étude clinique des dysprotéinémies.

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirais et les soignerais sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu :
Bordeaux, le 21 Juin 1956
Le Doyen,
R. SIGALAS.

Vu, bon à imprimer :
Le Président,
F. TAYEAU.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 25 Juin 1956
Le Recteur,
E. DELAGE.

18. Delage (B.). — Le système lipoprotéidique du sérum sanguin. Thèse Doct. Sc., Paris, 1939.
19. Delsal (J. L.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29**, 690.
20. Demeulenaere (L.) & Wieme (R. J.). — *Bull. Ass. Et. Foie Nutr.*, 1950, **13**, 120.
21. Denis (P. S.). — Mémoire sur le sang, 1 vol., 208 p., Baillière, édit., Paris, 1859.
22. Derrien (Y.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1944, **26**, 1091; *C. R. Soc. Biol.*, 1945, **139**, 909; *Svensk kemisk Tidskrift*, 1947, **59**, 139.
23. Derrien (Y.), Roche (J.) & Mandel (S.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, **25**, 348.
24. Dole (V. P.). — *J. am. chem. Soc.*, 1945, **67**, 1119.
25. Durrum (E. L.). — *J. am. chem. Soc.*, 1950, **72**, 2943; 1951, **73**, 4875.
26. Edsall (J. T.). — *Exp. ann. Bioch. méd.*, 1956, **18**, 87.
27. Fauvert (R.) & Hartmann (L.). — *Bull. Ass. Et. Foie Nutr.*, 1950, **13**, 155.
28. Ferry (R. M.), Cohn (E. J.) & Newman (E. S.). — *J. am. chem. Soc.*, 1936, **58**, 2370; 1938, **60**, 1480.
29. Florkin (M.). — *J. biol. Chem.*, 1930, **87**, 629.
30. Freund (E.) & Joachim (J.). — *Z. physiol. Chem.*, 1902, **36**, 407.
31. Fuld (E.) & Spiro (K.). — *Z. physiol. Chem.*, 1900, **31**, 132.
32. Gofman (J. W.), de Lalla (O.), Glazier (F.), Freeman (H. K.), Lindgren (F. T.), Michels (A. V.), Strisover (B. Y.) & Tamplin (A. R.). — *Plasma*, 1954, **2**, 413.
33. Gounelle (H.), Bachet (M.) & Sassier (R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 22; *Presse méd.*, 1943, **51**, n° 3, 20.
34. Grabar (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 72.
35. Grabar (P.). — La technique immunochimique quantitative et son emploi en immunologie et en chimie; *in* Loiseleur (J.) [75], **1**, 817-833.
36. Grabar (P.). — III[e] Congrès international de Biochimie, Bruxelles, 1955. Volume des Conférences et Rapports, Academic Press, édit., New York, 1956, pp. 37-41.
37. Grabar (P.) & Williams (C. A.). — *Biochim. biophys. Acta*, 1953, **10**, 193.
38. Gros (W.). — *Klin. Wochschr.*, 1940, **19**, 130; 1942, **21**, 877 et 969.
39. Gutman (A. B.), Moore (D. H.), Gutman (E. B.), mac Clellan (V.) & Kabat (E. A.). — *J. clin. Invest.*, 1941, **20**, 765.
40. Hammarsten (O.). — *Z. physiol. Chem.*, 1884, **8**, 467; *Ergebn. Physiol.*, 1903, **1**, 330.
41. Hanger (F. M.). — *Trans. Assoc. Am. Physicians*, 1938, **53**, 148; *J. clin. Invest.*, 1939, **18**, 261.

42. Hardy (W. B.) & Gardiner (S.). — *J. Physiol.*, 1910, **40,** LXVIII.
43. Hartmann (L.), Boivin (P.) & Fauvert (R.). — *Exp. ann. Bioch. méd.*, 1957, **19,** 13.
44. Havel (R. J.), Eder (H. H.) & Bragdon (J. H.). — *J. clin. Invest.*, 1955, **34,** 1345.
45. Havez (R.). — Possibilités et limites de l'électrophorèse sur papier dans l'étude des milieux biologiques humains. Thèse Doct. Méd., Lille, 1956.
46. Heidelberger (M.). — *Chem. Rev.*, 1939, **24,** 323; *Bacter. Rev.*, 1939, **3,** 49.
47. Heidelberger (M.) & Kabat (E. A.). — *J. exp. Med.*, 1934, **60,** 643.
48. Heidelberger (M.) & Kendall (F. E.). — *J. exp. Med.*, 1929, **50,** 809.
49. Heidelberger (M.), Sia (R. H.) & Kendall (F. E.). — *J. exp. Med.*, 1930, **52,** 477.
50. Hillyard (L. A.), Entenman (C.), Feinberg (H.) & Chaikoff (I. L.). — *J. biol. Chem.*, 1955, **214,** 79.
51. Hofmeister (F.). — *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1889, **25,** 1; 1889, **27,** 395; 1890, **28,** 210.
52. Homer (A.). — *Biochem. J.*, 1919, **13,** 278.
53. Hornus (G.) & Grabar (P.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1941, **66,** 136.
54. Howe (P.). — *J. biol. Chem.*, 1921, **49,** 93; 1923, **57,** 241.
55. Hückel (W.). — Structural chemistry of inorganic compounds, 2 vol., 1094 p., Elsevier publishing C°, inc., édit., New York, Amsterdam, Londres, Bruxelles, 1950.
56. Jayle (M. F.). — Dosage des protéines; *in* Loiseleur (J.) [75], **2,** 65-86.
57. Jencks (W. P.), Jetton (M. R.) & Durrum (E. L.). — *Biochem. J.*, 1955, **60,** 205.
58. Jolin (J.). — Recherches sur le fractionnement des protéines sériques par le molybdate d'ammonium. Thèse Doct. Univ. (Pharm.), Bordeaux, 1953.
59. Jourdain (A. M. E.). — Contribution au diagnostic biologique des ictères par des méthodes nouvelles. Thèse Doct. Méd., Bordeaux, 1947.
60. Kaminski (M.) & Ouchterlony (O.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951, **33,** 758; voir aussi Kaminski (M.), *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36,** 279 et 289; *Biochim. biophys. Acta*, 1954, **13,** 216.
61. Kauder (G.). — *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1886, **20,** 411.
62. Kekwick (R. A.), Mackay (M. E.) & Record (B. R.). — *Nature*, 1946, **157,** 629.
63. Killeffer (D. H.) & Linz (A.). — Molybdenum compounds. Their chemistry and technology, 1 vol., 407 p., Interscience publishers, édit., New York, Londres, 1952.

64. Kingsley (G. R.). — *J. biol. Chem.*, 1939, **131**, 197.
65. Köiw (E.), Wallenius (G.) & Grönwall (A.). — *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 1952, **4**, 47.
66. Kolthoff (I. M.) & Lingane (J. J.). — Polarography, 2e édit., 2 vol., 990 p., Interscience publ., édit., New York, Londres, 1952.
67. Kühne. — Lehrbuch der physiologischen Chemie, 1 vol., Leipzig, 1886.
68. Kunkel (H. G.), Ahrens (E.) & Eisenmenger (W.). — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1947, **66**, 217; *J. clin. Invest.*, 1947, **26**, 1060.
69. Kunkel (H. G.), Ahrens (E.) & Eisenmenger (W.). — *Gastroenterology*, 1948, **11**, 499.
70. Kunkel (H. G.) & Tiselius (A.). — *J. gen. Physiol.*, 1951, **35**, 89.
71. Lefrou (G.) & Bonnet (P.). — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1934, **27**, 35.
72. Lewis (L. A.), Green (A. A.) & Page (I. H.). — *Am. J. Physiol.*, 1952, **171**, 391.
73. Lindgren (F. T.), Gofman (J. W.) & Elliott (H.). — *J. phys. coll. Chem.*, 1951, **55**, 80 et 156.
74. Löffler (W.), Wuhrmann (F.) & Wunderly (Ch.). — Congrès français de Médecine, XXVIIe session, Genève, 1949. Volume des rapports, Masson & Cie, édit., Paris, 1950, pp. 91-113.
75. Loiseleur (J.) (en collaboration). — Techniques de Laboratoire, 2e édit., 2 vol., 930 et 444 p., Masson & Cie, édit., Paris, 1953.
76. Mac Farlane (A. S.). — *Biochem. J.*, 1935, **29**, 407, 660, 1175 et 1202; *Nature*, 1942, **149**, 439.
77. Mac Farlane (A. S.). — *Biochem. J.*, 1935, **29**, 1209.
78. Machebœuf (M.). — Etat des lipides dans la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique, 1 vol., 78 p., Hermann & Cie, édit., Paris, 1936.
79. Machebœuf (M.). — *Exp. ann. Bioch. méd.*, 1943, **3**, 39.
80. Machebœuf (M.). — Congrès français de Médecine, XXVIIe session, Genève, 1949. Volume des rapports, Masson & Cie, édit., Paris, 1950, pp. 5-48.
81. Machebœuf (M.). — Microélectrophorèse des protéines dans le papier; *in* Loiseleur (J.) [75], **1**, 571-585.
82. Machebœuf (M.) & Duboy (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 272.
83. Machebœuf (M.) & Januskiewicz (M.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 694.
84. Machebœuf (M.), Lacaille (P.) & Rebeyrotte (P.). — *Bull. Soc. Chim., biol.*, 1947, **29**, 402.

85. Maclagan (N. F.). — *Brit. J. exp. Path.*, 1944, **25,** 234; *Nature,* 1944, **154,** 670.
86. Maclagan (N. F.) & Bunn (D.). — *Biochem. J.*, 1947, **41,** 580 et XIX.
87. Marcus (E.). — *Z. physiol. Chem.*, 1899, **28,** 559.
88. Marquevielle (J.), Jensen (R.), Jolin (J.) & Tayeau (F.). — *Bull. Soc. chim. France,* 1957, 1137.
89. Martin (M.). — Recherches sur le fractionnement des protéides sériques. Thèse Doct. Univ. (Pharm.), Bordeaux, 1944.
90. Meites (L.). — Polarographic techniques, 1 vol., 317 p., Interscience publ., édit., New York, Londres, 1955.
91. Michailow (W.). — *Jahresb. Thierchem.*, 1884, **14,** 7.
92. Morris (C. J.) & Hoch (H.). — *Nature,* 1945, **156,** 234.
93. Neefe (J. R.) & Reinhold (J. G.). — *Gastroenterology,* 1946, **7,** 393.
94. Neuzil (E.) & Martin (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138,** 586.
95. Oncley (J. L.), Gurd (F. R. N.) & Melin (M.). — *J. am. chem. Soc.*, 1950, **72,** 458.
96. Oncley (J. L.), Melin (M.), Cameron (J. W.), Richert (D. A.) & Diamond (L. K). — *Ann. New York Acad. Sc.*, 1946, **46,** 899.
97. Oncley (J. L.), Scatchard (G.) & Brown (A.). — *J. phys. coll. Chem.*, 1947, **51,** 184.
98. Ouchterlony (O.). — *Ark. Kemi Miner. Geol.*, 1948, **25,** 14; 1949, **26,** 1; 1950, **27,** 43 et 55; *Acta path. microbiol. scand.*, 1948, **25,** 186; 1949, **26,** 507; 1953, **32,** 231; *Lancet,* 1949, **256,** 346.
99. Oudin (J.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1946, **222,** 115; 1949, **228,** 1890; *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29,** 140; *Ann. Inst. Pasteur,* 1948, **75,** 30.
100. Panum (P.). — *Virchows Arch. path. Anat.*, 1851, **3,** 251; 1852, **4,** 17 et 419.
101. Pavolini (T.). — *In Chem. Abstr.*, 1930, **24,** 2664.
102. Pedersen (K. O.). — Ultracentrifugal studies on serum and serum fractions, 1 vol., 178 p., Alqvist et Wiksells, édit., Upsala, 1945.
103. Pedersen (K. O.). — *J. phys. coll. Chem.*, 1947, **51,** 156.
104. Perez (J. J.). — Contribution à l'étude de la solubilité des protéides. Thèse Doct. Sc., Paris, 1939.
105. Perlmann (G. E.) & Kaufmann (D.). — *J. am. chem. Soc.*, 1945, **67,** 638.
106. Piettre (M.) & Vila (A.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1920, **170,** 1466; *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1921, **3,** 483.
107. Pillemer (L.) & Hutchinson (M. C.). — *J. biol. Chem.*, 1945, **158,** 299.

108. Pinkus (S. N.). — *J. Physiol.*, 1901, **27,** 57.
109. Pohl (J.). — *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1886, **20,** 426.
110. Polonovski (J.). — *Exp. ann. Bioch. méd.*, 1957, **19,** 69.
111. Porges (O.) & Spiro (K.). — *Beitr. chem. Physiol. Path.*, 1903, **3,** 277.
112. Poullain (P.) & Piette (M.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1948, **30,** 496.
113. Recant (L.), Chargaff (E.) & Hanger (F. M.). — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1945, **60,** 245.
114. Riebeling (C.). — *Klin. Wochschr.*, 1943, **22,** 648.
115. Roch (M.). — Congrès français de Médecine, XXVII[e] session, Genève, 1949. Volume des discussions et communications, Masson & C[ie], édit., Paris, 1950, pp. 12-23.
116. Roche (A.), Dorier (M.) & Samuel (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121,** 1019; 1936, **122,** 231.
117. Roche (A.), Samuel (L.) & Arthaud (R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125,** 1061.
118. Roche (J.) & Derrien (Y.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1946, **28,** 838.
119. Russ (E. M.), Raymunt (J.) & Barr (D. P.). — *Am. J. Med.*, 1951, **11,** 469.
120. Saïas (E.). — Contribution à l'étude des associations lipoprotéidiques en couches moléculaires à la surface de solutions aqueuses. Thèse Doct. Pharm., Paris, 1942; *J. Chim. Phys.*, 1943, **40,** 113.
121. Sandor (G.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1951, **232,** 2492.
122. Sandor (G.). — *Algérie méd.*, 1952, **56,** 93.
123. Sandor (G.) & Sabetay (Y.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36,** 613.
124. Sandor (G.), Sabetay (Y.) & Vargues (R.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1953, **35,** 273.
125. Sandor (G.) & Weill-Fage (J. C.). — *Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1950, **66,** 1466; *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79,** 130.
126. Schmidt (V.). — *Arch. Anat. Physiol.*, 1862, **48,** 428.
127. Shay (H.), Berk (J. E.) & Siplet (H.). — *Gastroenterology*, 1947, **9,** 641.
128. Siegfried (E. M.). — *Biochem. J.*, 1939, **33,** 924.
129. Spealman (C. R.), Newton (M.) & Post (R. L.). — *Am. J. Physiol.*, 1947, **150,** 628.
130. Starke (K. V.). — *Jahresb. Thierchem.*, 1881, **11,** 17.
131. Svedberg (T.) & Pedersen (K.). — The Ultracentrifuge, 1 vol., 478 p., Clarendon Press, édit., Oxford, 1940.
132. Svensson (H.). — *Ark. Kemi Miner. Geol.*, 1943, **17,** n° 14; 1946, **22,** n° 10.
133. Tayeau (F.) & Martin (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137,** 503.

134. Tayeau (F.) & Neuzil (E.). — Congrès français de Médecine, XXVII[e] session, Genève, 1949. Volume des rapports, Masson & C[ie], édit., Paris, 1950, pp. 53-89.
135. Theorell (H.) & Widström (G.). — *Z. ges. exp. Med.*, 1931, **75,** 692; d'après *Chem. Abstr.*, 1932, **26,** 2206.
136. Tiselius (A.). — *Nova Acta Soc. Sc. upsalien.*, 1930, série 4, **7,** 1-107; *Trans. Faraday Soc.*, 1937, **33,** 524; *J. exp. Med.*, 1937, **65,** 641; 1939, **69,** 83 et 119; voir aussi Tiselius (A.), Henschen (G. E.) & Svensson (H.), *Biochem. J.*, 1938, **32,** 1814; Tiselius (A.) & Eriksson-Quensel (I. B.), *Biochem. J.*, 1939, **33,** 1752.
137. Tiselius (A.). — *Biochem. J.*, 1937, **31,** 313 et 1464.
138. Vargues (R.). — *Algérie méd.*, 1952, **56,** 99.
139. Vargues (R.) & Le Filliatre (M.). — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1956, **49,** 713.
140. Vargues (R.) & Raffi (A.). — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1953, **46,** 222.
141. Vargues (R.) & Sandor (G.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1951, **233,** 1146.
142. Vernes (A.), Bricq (R.) & Gager (A.). — *Arch. Inst. prophyl. (Paris)*, 1926, n° 4.
143. Verschure (J. C.). — Elecktrophorese en serumlokkingo-reactus, 1 vol., Amsterdam, 1946.
144. Waldenström (J.). — *Acta med. scand.*, 1944, **117,** 216; *Schweiz. med. Wochschr.*, 1948, **78,** 927.
145. Waldenström (J.). — Congrès français de Médecine, XXVII[e] session, Genève, 1949. Volume des rapports, Masson & C[ie], édit., Paris, 1950, pp. 49-52.
146. Weyl (T.). — *Z. physiol. Chem.*, 1877, **1,** 72.
147. Wu (H.). — *Chin. J. Physiol.*, 1933-1934, **7,** 125.
148. Wuhrmann (F.) & Wunderly (C.). — *Helv. chim. Acta*, 1943, suppl. X, 138.
149. Wuhrmann (F.) & Wunderly (C.). — Die Bluteiweisskörper des Menschen, 1 vol., Benno Schwabe & C[ie], édit., Bâle, 1947.
150. Wunderly (C.). — *Helv. chim. Acta*, 1942, **25,** 498.
151. Wunderly (C.) & Wuhrmann (F.). — *Schweiz. med. Wochschr.*, 1945, **75,** 1128; *Brit. J. exp. Path.*, 1947, **28,** 286.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

Avant-Propos 1

PREMIÈRE PARTIE

Notions générales sur les protéines sériques et les dysprotéinémies.

Chapitre premier. — Les protéines du sérum sanguin et leur fractionnement 5

I. — Fractionnement par modification de la force ionique 7

II. — Fractionnement par modification du *p*H 14

III. — Fractionnement par addition de solvants organiques 16

A. — Acétone 16

B. — Ether 17

C. — Méthanol et méthylal 17

D. — Ethanol 17

IV. — Fractionnement fondé sur les différences de vitesse de sédimentation : ultracentrifugation 18

V. — Fractionnement fondé sur les différences de mobilité dans un champ électrique : électrophorèse. 21

A. — Electrophorèse en milieu liquide ou en cellule 21

B. — Microélectrophorèse sur papier 23

VI. — Fractionnement par des techniques diverses 26

Conclusions du chapitre premier 27

Pages

Chapitre II. — Les dysprotéinémies et leur étude 28

I. - Les dysprotéinémies 29

A. — Les hypoprotéinémies 29

B. — Les hyperprotéinémies 30

II. — Méthodes d'étude des dysprotéinémies 31

A. — Méthode d'α-globulinométrie 33

B. — Méthodes de β-globulinométrie 33

C. — Méthodes de γ-globulinométrie 37

D. — Méthodes d'étude de la labilité colloïdale 38

Conclusions du chapitre II 43

DEUXIÈME PARTIE

Recherches expérimentales.

Chapitre premier. — Action du molybdate d'ammonium sur les protéines sériques 47

Conclusions du chapitre premier 65

Chapitre II. — Réalisation d'un test de dysprotéinémie au moyen du molybdate d'ammonium 67

Conclusions du chapitre II 70

Chapitre III. — Etude clinique des dysprotéinémies au moyen du test au molybdate 71

I. — Le test au molybdate dans les dysprotéinémies d'origine hépatique 71

II. — Le test au molybdate dans les dysprotéinémies d'origine extrahépatique 75

Conclusions du chapitre III 79

Conclusions générales 81

Références bibliographiques 85

Bordeaux. — Impr. E. Drouillard, 3, place de la Victoire.